

多糖修飾大豆たん白質の高品質化に及ぼす糖鎖長の影響

EFFECTS OF THE LENGTH OF POLYSACCHARIDE CHAINS ON
THE IMPROVEMENT OF THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF SOY
PROTEIN MODIFIED WITH POLYSACCHARIDES

加藤昭夫・木原由代・佐原重広(山口大学農学部)

Akio KATO, Yukiyo KIHARA and Shigehiro SAHARA

Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi
University, Yamaguchi 753

ABSTRACT

Soy protein was covalently attached to various kinds and sizes of polysaccharides in a controlled dry state (60°C, 79% relative humidity) through Maillard reaction between the ϵ -amino groups in protein and the reducing-end carbonyl residue in polysaccharide. The length of polysaccharide chains in Maillard-type soy protein-polysaccharide conjugates greatly affected the emulsifying properties, regardless of the kinds of polysaccharides. The larger the length of polysaccharide chains, the greater the increases in the emulsifying properties of protein-polysaccharide conjugates. Among the polysaccharides used in the experiment, dextran and xyloglycan having the molecular weight of 200-300 kDa and 470 kDa, respectively, were most remarkably improved the emulsifying properties of protein-polysaccharide conjugates. The importance of the length of polysaccharide chains in the emulsifying properties of protein-polysaccharide conjugates was further proved by using polymannosyl and oligomannosyl lysozymes constructed by genetic engineering. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 7-12, 1994.

本研究者らはたん白質と多糖類を、コントロールした乾燥下でメイラード反応により結合させると、その溶解性、熱安定性、乳化性などが改変できること、特に乳化性は市販の乳化剤よりも酸性下、高塩濃度下で優れた特性を示すことを明らかにしてきた¹⁻¹⁰⁾。しかしながら、大豆たん白質は他の食品たん白質に比べ多糖類との結合による高機能化の程度が低い。この理由を明らかにすれば、大豆たん白質の一層の高度利用につながる。その理由として、用いる多糖類の種類、多糖鎖長の影響が考えられるが、前者についてはすでに検討しており直鎖構造のものは望ましくなく、分岐した構造のものがよいことをすでに明らかにしている。

したがって本研究では、多糖の鎖長がこうした機能に及ぼす影響を調べ、大豆たん白質の機能改変にどの

程度の鎖長が望ましいのかを明らかにすることを目的とする。また我々は遺伝子工学的手法で糖鎖長の異なるグリコシル化リゾチームの酵母での発現に成功しており¹¹⁾、この結果と比較し、たん白質と多糖類の複合体の乳化機能に及ぼす糖鎖長の効果に共通した法則性のあることを明らかにしたのでこのことについても報告する。

実験方法

実験材料

低温抽出脱脂大豆(不二製油製)から酸沈澱たん白質を調製し、大豆たん白質として用いた。多糖類としてガラクトマンナン(グアーガムのマンナーゼ加水分解物)、キシログリカン(タマリンドガムのセルラーゼ

加水分解物), デキストランを用いた。各々の多糖の分子量の異なるものを調製又は購入し試料とした。

大豆たん白質-多糖類複合体の調製

大豆たん白質と分子量の異なる種々の多糖類との混合物をモル比で1:5(高分子量のキシログリカンの場合は重量比で1:5)の割合で混合し適量の水に溶解させた後に凍結乾燥した。この粉末を相対湿度79%に制御したデシケーター中で、60℃で数日間反応させ複合体を形成した。

乳化性の測定

調製した大豆たん白質-多糖複合体の乳化性はPearceとKinsellaの方法¹²⁾を用いて測定した。1/15 Mリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.4)に試料をたん白質濃度で0.1%になるように溶解した。この試料溶液3 mLにコーンオイル1 mLを加えポリトロンを用いて12,000 rpmで1分間ホモゲナイズした。形成したエマルジョン0.1 mLをホモゲナイズ直後、1, 2, 3, 5, 10分後に試験管底部から取り0.1% SDS溶液5 mL中に懸濁させ、その濁度を500 nmの吸光度で測定した。ホモゲナイズ直後の値を相対乳化活性として表し、その半減期を乳化安定性として示した。

低角レーザー光散乱法による分子量測定

多糖類及びたん白質-多糖複合体の分子量測定はHPLCで溶出する画分を低角レーザー光散乱法により測定した¹³⁾。

結果と考察

大豆たん白質-多糖複合体の乳化性

大豆たん白質との複合体形成に用いる多糖として、デキストラン、ガラクトマンナン、キシログリカンを用いた。これらの多糖はいずれも天然の素材で安価で入手できること、機能性繊維としての作用を有すること、分岐した糖鎖長はそれほど長くない多糖であることが共通している。我々がこれまで調べたところ、直鎖構造の多糖あるいはネットワーク状に分岐した構造の多糖とたん白質の複合体は機能性の改変があまり認められなかったために、上記の多糖を選んだ。

Fig. 1は大豆たん白質-ガラクトマンナン複合体の乳化性を示している。複合体は5日、10日間反応させたものを示した。コントロールとして未反応の大豆たん白質とガラクトマンナンの混合物(0日)を示している。縦軸はエマルジョンの濁度を示し、0時間(エ

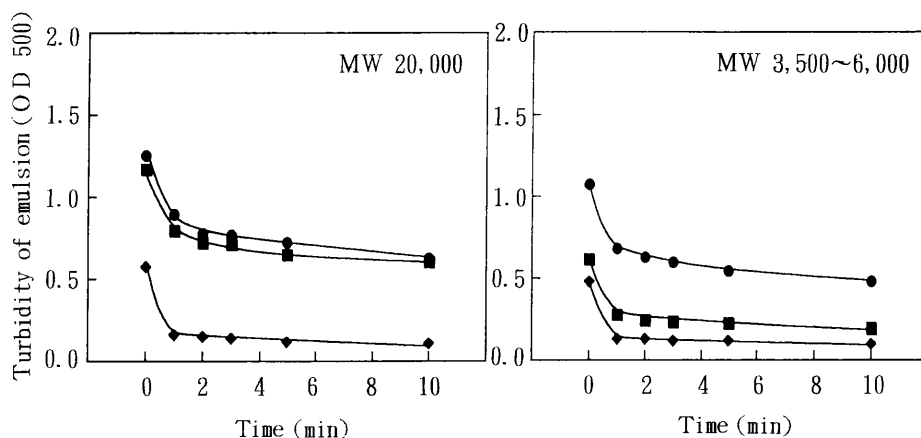


Fig. 1. Changes in the emulsifying properties of APP-galactomannan conjugates during dry-heating at 60°C.

- ◆, mixture of soy protein (APP) and galactomannan without dry-heating
- , soy protein-galactomannan conjugate prepared by dry-heating at 60°C for 5 days
- , soy protein-galactomannan conjugate prepared by dry-heating at 60°C for 10 days

Left, The molecular weight of galactomannan in the conjugates was 20,000.

Right, The molecular weight of galactomannan in the conjugate was 3,500-6,000.

マルジョン形成直後)の値は相対乳化活性を示し、この値が高いほど乳化能力が高いことを表している。横軸はエマルジョン形成後の放置時間を示し、0時間後

の値の半減期を乳化安定性の表示法として用いた。未反応の混合物は乳化活性、乳化安定性共に低いが、5日、10日と複合体が形成されると、これらの乳化性が

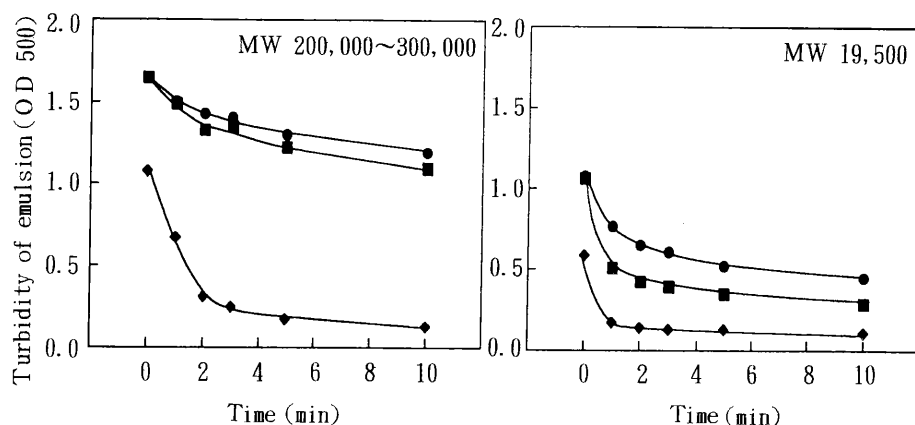


Fig. 2. Changes in the emulsifying properties of APP-dextran conjugates during dry-heating at 60°C.

◆, mixture of soy protein (APP) and dextran without dry-heating
 ■, soy protein-dextran conjugate prepared by dry-heating at 60°C for 5 days
 ●, soy protein-dextran conjugate prepared by dry-heating at 60°C for 10 days
 Left, The molecular weight of dextran in the conjugates was 200,000~300,000.
 Right, The molecular weight of dextran in the conjugate was 19,500.

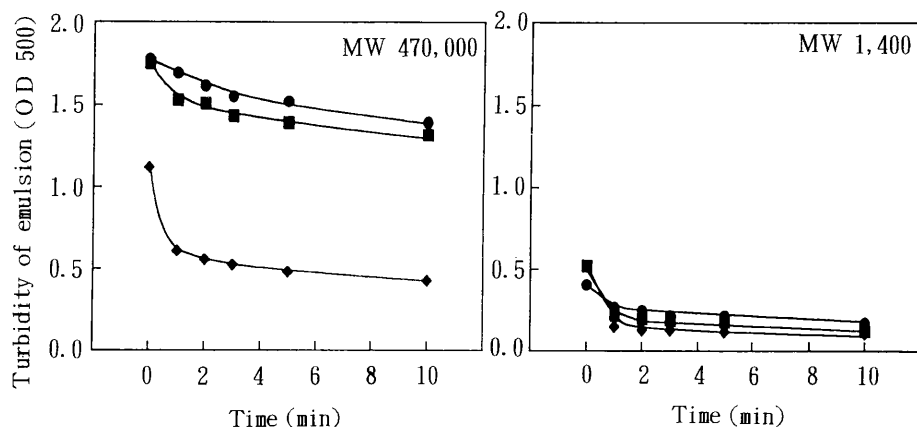


Fig. 3. Changes in the emulsifying properties of APP-xyloglycan conjugates during dry-heating at 60°C.

◆, mixture of soy protein (APP) and xyloglycan without dry-heating
 ■, soy protein-xyloglycan conjugate prepared by dry-heating at 60°C for 5 days
 ●, soy protein-xyloglycan conjugate prepared by dry-heating at 60°C for 10 days
 Left, The molecular weight of xyloglycan in the conjugates was 470,000.
 Right, The molecular weight of xyloglycan in the conjugate was 1,400.

改変されることが分かる。10日以後は同様の値を示すので、複合体は数日間で十分に形成されることを示している。ガラクトマンナンは分子量2万のものと数千(3,500-6,000)のものを用いて、多糖の分子サイズによるたん白質との複合体の乳化性を比較した。図から明かなように、大きなガラクトマンナン分子の方が高い乳化性が認められる。ガラクトマンナン分子は2万以上のものが入手できなかったため、以下に、より高分子量のデキストラン、キシログリカンを用いて多糖の分子サイズの影響を検討した。

デキストランは市販のもので分子量20-30万の高分子成分と2万のものが得られるのでこれらを用いて比較した。Fig. 2に示したように、高分子量のデキストランと大豆たん白質の複合体が著しく高い乳化活性、乳化安定性を示すことが明らかとなった。

この結果をさらに確認するために、タマリンドガム由来のキシログリカン可溶性高分子画分を分別し、低

角レーザー光散乱法で測定した分子量47万の多糖を用いて実験を行った。この高分子量キシログリカン-大豆たん白質複合体はさらに高い乳化性を示した (Fig. 3)。これに対して、低分子量(1,400)のキシログリカンとたん白質との複合体は乳化性の改変が極めて少ないことが明らかになった。オクタマーの低分子量キシログリカンよりさらに低分子量のラクトース、グルコースを用いて、さらに同様の大豆たん白質複合体を作成し、乳化性を調べたところ、低分子量キシログリカンよりさらに低い乳化性を示した (Fig. 3)。

Fig. 4にこれらの種類と分子サイズの異なる種々の多糖又はオリゴ糖、単糖と大豆たん白質複合体の乳化性と用いた糖のサイズとの相関関係を示した。乳化活性は糖の分子量と直線的な相関 ($r=0.98$) があり、乳化安定性は曲線的な相関 ($r=0.94$) があることが示された。これらの結果から大豆たん白質の場合には数十万の多糖との複合体形成により優れた乳化性を示し、

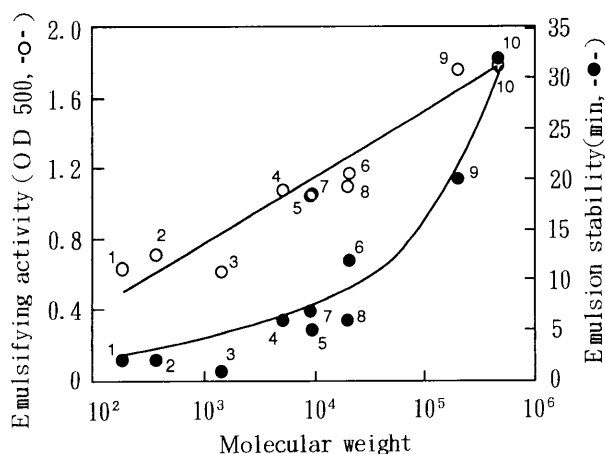


Fig. 4. Relationships between the molecular weight of saccharides and the emulsifying properties of APP-saccharide conjugates. 1, glucose; 2, lactose; 3, xyloglycan (MW 1,400); 4, galactomannan (MW 3,500-6,000); 5, galactomannan (MW 10,000); 6, galactomannan (MW 20,000); 7, dextran (MW 9,300); 8, dextran (MW 19,600); 9, dextran (MW 200,000-300,000); 10, xyloglycan (MW 470,000). The values of emulsifying activity and emulsion stability in each APP-saccharide conjugate were shown as the maximal values in various storage days.

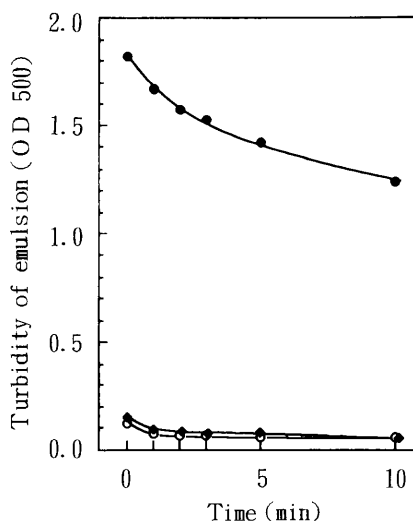


Fig. 5. Emulsifying properties of polymannosyl and oligomannosyl lysozymes constructed by genetic engineering. ●, polymannosyl lysozyme; ◆, oligomannosyl lysozyme; ○, nonglycosyl lysozyme.

これまで我々が用いていた数万の多糖では乳化性改変の効果が少ないことが明らかとなった。大豆より分子量の小さい卵白たん白質の場合は数万の多糖との複合体で十分な乳化性の改変がみられることから考えると、たん白質-多糖複合体の乳化性には両者の分子サイズのバランスが重要な因子であるのかもしれない。大豆酸沈澱たん白質はグリシニン、コングリシニンの混合物であり、分子量は20万から36万のものが多糖と複合体を形成するために、これに匹敵するサイズの多糖の場合は優れた乳化性を示すのは興味深い結果である。

メイラード型のたん白質-多糖複合体はエマルジョン形成時に生じた油滴界面でたん白質の疎水部分は油滴のアンカーとなり強く結合し、たん白質に結合した多糖は油滴の周りの水と結合しその構造を安定化し、油滴間の合一を妨げ、安定なエマルジョンを形成すると考えられる。この場合にたん白質部分のサイズが大きいと小さな糖ではたん白質表面を効果的に覆うことができずに油滴の合一が阻害できなくなると考えられる。

最後にこの多糖鎖長の乳化性に及ぼす影響を分子レベルで明らかにするために、遺伝子工学的手法で作成した多糖鎖長の異なるオリゴマンノシル化リゾチームとポリマンノシル化リゾチームを用いた結果を示した。リゾチーム cDNA を部位指定変異により49-51位に糖鎖認識配列 Asn-X-Thr を挿入し、49位の Asn に N-グリコシル型糖鎖が結合するように形質転換した酵母発現系で高マンノース型(約300残基のマンノース)のポリマンノシル化リゾチームとコア型(10数個のマンノース)のオリゴマンノシル化リゾチームを分泌させたものを試料とした¹¹⁾。Fig. 5に示したように、ポリマンノシル化リゾチームは著しく高い乳化性を示すが、オリゴマンノシル化リゾチームは乳化性の改変がほとんど認められなかった¹⁴⁾。こうして、分子レベルで多糖鎖長の乳化性に及ぼす重要性が証明された。

今回はたん白質-多糖複合体の乳化性以外の機能改変について述べなかったが、溶解性、熱安定性も多糖鎖長に比例して改変されることも明らかになっている。

文 献

- 加藤昭夫, 小林邦彦 (1990): 多糖修飾による蛋白質の機能改変. 化学と生物, **28**, 285-287.
- 加藤昭夫 (1990): 多糖類修飾蛋白質の機能変換. タンパク質ハイブリッド, 第3巻, 共立出版, pp. 265-276.
- Kato A, Sasaki Y, Furuta R and Kobayashi K (1990): *Agric Biol Chem*, **54**, 107-112.
- Kato A and Kobayashi K (1991): Excellent emulsifying properties of protein-dextran conjugates. In: *Microemulsions and Emulsions in Food. American Chemical Society Symposium Series*, **448**, 213-229.
- Kato A, Shimokawa K and Kobayashi K (1991): Improvement of the functional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugation. *J Agric Food Chem*, **39**, 1053-1056.
- Nakamura S, Kato A and Kobayashi K (1991): New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J Agric Food Chem*, **39**, 647-650.
- Nakamura S, Kato A and Kobayashi K (1992): Bifunctional lysozyme-galactomannan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect. *J Agric Food Chem*, **40**, 735-739.
- Kato A, Mifuru R, Matsudomi N and Kobayashi K (1992): Functional casein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry heating. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 567-571.
- Nakamura S, Kato A and Kobayashi K (1992): Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *J Agric Food Chem*, **40**, 2033-2037.
- Kato A, Minaki K and Kobayashi K (1993): Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by the attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state. *J Agric Food Chem*, **41**, 540-543.
- Nakamura S, Takasaki H, Kobayashi K and Kato A (1993): Hyperglycosylation of hen egg white lysozyme in yeast. *J Biol Chem*, **268**, 12706-12712.
- Pearce KM and Kinsella JE (1978): Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J Agric Food Chem*, **26**, 716-723.
- Kato A, Kameyama K and Takagi T (1992): Molecular weight determination and compositional analysis of dextran-protein conjugates using low-angle laser light scattering technique combined with HPLC. *Biochim Biophys Acta*, **1159**, 22-28.

- 14) Nakamura S, Kobayashi K and Kato A (1993):
Novel surface functional properties of
polymannosyl lysozyme constructed by
genetic modification. *FEBS Lett*, **328**, 259-262.