

大豆たん白質の低水分活性下での自発的脱アミド化による高品質化

Improvement of the Functional Properties of Soy Protein by Spontaneous Deamidation Occurred in a Low Water Activity

加藤昭夫・藤澤奈央・松富直利（山口大学農学部）

Akio KATO, Nao FUJISAWA and Naotoshi MATSUDOMI

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

ABSTRACT

Soy protein (APP) was deamidated by a controlled dry-heating (relative humidity 65%, 60°C) in an atmosphere of nitrogen gas without a drop of solubility. After 7 days storage of soy proteins, the deamidation rates were 8.2, 12.2 and 14.3 percents at pH 5.5, 8.0 and 10.0, respectively, suggesting that a considerable deamidation occurred in dry-heating. Deamidated soy proteins resulted in remarkable improvements of the emulsifying properties in proportion to the deamidation rates. On the other hand, the improvement of foaming properties was also observed by the deamidation of soy protein, regardless of the deamidation rate. These results suggest that a controlled dry-heating in an atmosphere of nitrogen gas is an useful method for improving food functionality of soy protein. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 104-108, 1995.

大豆たん白質は種子たん白質に共通した特徴であるがグルタミン、アスパラギンのアミド型のアミノ酸を多く含んでおり、グリシニンでは全アミノ酸の18%がこれらのアミド型アミノ酸である。こうした特徴から、大豆たん白質の脱アミド化により、グルタミン酸、アスパラギン酸の負荷電が増加し、高次構造の安定性が低下するために、溶解性、乳化性、起泡性など食品素材として重要な機能特性が改変されることが予測され、研究が行われてきた。しかしながら、これまでに用いられてきた希酸処理¹⁾やプロテアーゼ処理²⁾によるたん白質の脱アミド化はペプチドの開裂も同時に生じるために正確に脱アミドだけの影響を調べることは困難であった。本研究者は、卵白たん白質が貯蔵中に自発的に脱アミド化を生じることを報告³⁾している。本研究では、大豆たん白質を乾燥下での貯蔵により自発的に脱アミド化を生じるための条件を検討したところ、窒素ガス中で乾燥大豆たん白質を貯蔵することにより、溶解性を比較的低下させずに機能特性を改変できるこ

とが明らかになったので報告する。

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（APP）を調製し⁴⁾、大豆たん白質として用いた。

大豆たん白質の自発的脱アミド化

酸沈澱大豆たん白質を水に溶解させた後に、pH 5.5, 8.0, 10.0に調整し、凍結乾燥した。これらの粉末を窒素ガス中で種々の相対湿度に制御したデシケーター中で、60°Cで1～2週間貯蔵することにより脱アミド化を行った。

脱アミド化率の測定

7日間、上述の条件下で自発的に脱アミド化した試料を蒸留水に対して48時間透析し、遊離のアミド基を除去する。透析後に各試料は凍結乾燥し、得られた乾燥粉末試料（50 mg）は1 mLの2 N塩酸に溶解し封管

中で110°Cで2時間加水分解し、残存するアミドをアンモニアガスとして塩酸中に捕捉し、これに等量の10% TCA溶液を加え、除たん白し遠心分離で不溶物を除去し透明な上澄液を調製した。こうして得られた塩酸溶液中のアンモニアをアンモニアイオン電極により定量した。この方法は定量前にpHをアルカリにすることにより生ずるアンモニアガスを測定できる。

溶解度の測定

各々の条件下で得られた乾燥貯蔵粉末を一定量とり、水に溶かした試料の280 nmでの吸収を測定することにより溶解度を調べた。

乳化性の測定

自発的に脱アミド化した大豆たん白質の乳化性は

PearceとKinsellaの方法⁵⁾を用いて測定した。1/15Mリン酸ナトリウムバッファー(pH7.4)に試料をたん白質濃度で0.1%になるように溶解する。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12,000rpmで1分間ホモゲナイズする。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。

起泡性の測定

0.1 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0.2%になるように溶解し、加藤らの

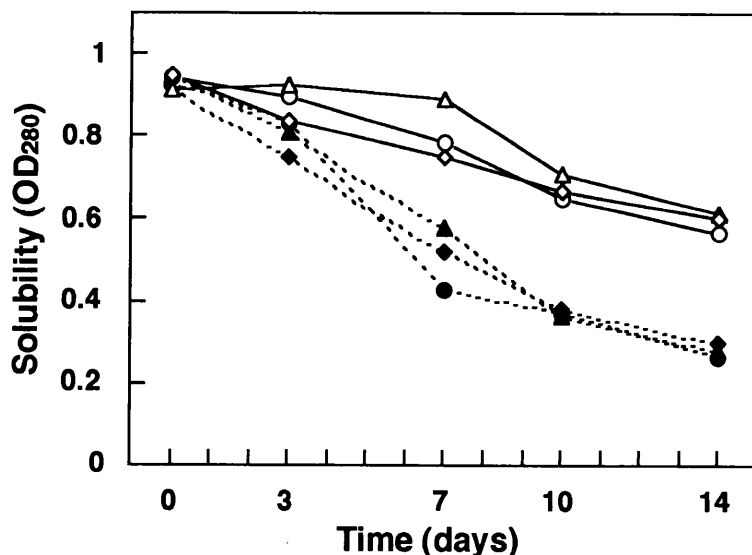


Fig. 1. Changes in the solubility of APPs during storage in the atmosphere of N₂ gas.

---●--- APP —○— N₂-APP
 ---▲--- APP/pH 8 —△— N₂-APP/pH 8
 ---◆--- APP/pH 10 —◇— N₂-APP/pH 10

Table 1. Deamidation of APP during storage in dry-heating for 7 days

Sample	Degree of deamidation (%)
Dry-heating	
Stored in N ₂ gas at pH 5.5	8.2
Stored in N ₂ gas at pH 8.0	12.2
Stored in N ₂ gas at pH 10.0	14.3
Mild acid hydrolysis*	8.5

*Treated with 0.1N HCl at 70°C for 3 hrs.

導電率法⁶⁾により起泡性、気泡安定性を測定した。

結果と考察

大豆たん白質は乾燥加熱により、極めて不溶化しやすく、60°Cの乾燥加熱下では数日後に大部分不溶化した。これは大豆たん白質に特有の性質であり、SH, SS交換反応による凝集体形成による。この不溶化を防止するために、窒素ガスで充填したデシケーター中で酸化を抑え、湿度をコントロールした条件下で乾燥加熱

を行った。Fig. 1に窒素ガス中と空気中で相対湿度65%、60°Cでの貯蔵中の大豆たん白質の溶解度変化を示した。窒素ガス充填下では7日間貯蔵ではほとんど溶解度に変化を与えずに貯蔵できるが、空気中では50%にまで低下した。相対湿度79%での貯蔵は一層不溶化を促進するため、65%湿度、60°C、7日間貯蔵した試料の性質を以下に調べた。

Table 1に窒素ガス中で相対湿度65%、60°C、7日間貯蔵した大豆たん白質の脱アミド化率を示した。乾燥粉末のpHは乾燥前の溶液のpHを示し、貯蔵後に溶液

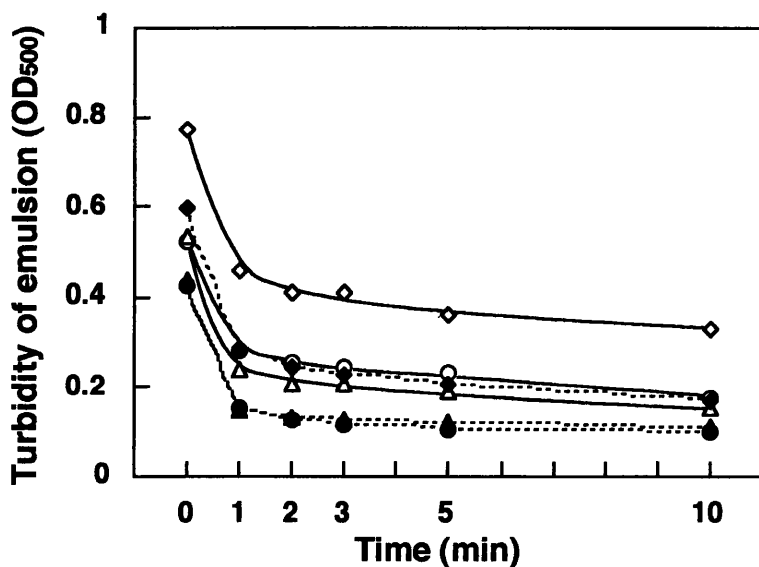


Fig. 2. Emulsifying properties of deamidated APPs.

---●--- N₂-APP (0 day) —○— N₂-APP (7 days)
 ---▲--- N₂-APP/pH 8 (0 day) —△— N₂-APP/pH 8 (7 days)
 ---◆--- N₂-APP/pH 10 (0 day) —◇— N₂-APP/pH 10 (7 days)

Table 2. Emulsifying activity emulsion stability of deamidated APPs

Sample	Emulsifying activity (OD ₅₀₀)	Emulsion stability (min)
Stored in N ₂ gas at pH 5.5		
0 day	0.428	0.7
7 days	0.523	1.7
Stored in N ₂ gas at pH 8.0		
0 day	0.438	0.7
7 days	0.531	1.0
Stored in N ₂ gas at pH 10.0		
0 day	0.596	1.0
7 days	0.772	3.0

にしても同じ値になる。この結果から、乾燥粉末のpHがアルカリ側になるほど脱アミド化率は増加することがわかる。このように、脱アミド化が乾燥下での貯蔵中に8～14%も生じることは大変興味深いことである。対照として、これまでよく用いられてきた希酸(0.1N塩酸溶液)中で70°C、3時間の加水分解による脱アミド化率は8.5%であり、このことから乾燥下で自発的に生じる脱アミド化の程度が大きいことを示している。希酸中での加熱はペプチドの加水分解も起る可能性があり、乾燥下ではこうした副反応はないのでより優れた方法といえる。

Fig. 2はこうして得られた脱アミド化大豆たん白質の乳化性を示している。図から明らかなように、乾燥加熱で脱アミド化した大豆たん白質の乳化性は著しく改変され、特にpH 10で貯蔵したものは優れた乳化性を示した。

Table 2は脱アミド化による乳化活性、乳化安定性の値を示した。乳化活性はいずれのpHでも7日間貯蔵の試料は貯蔵前の1.2～1.3倍に増加し、乳化安定性は2.5～3.0倍に改変された。

このように乾燥下での自発的脱アミド化により大豆たん白質の乳化性が著しく上昇することが示された。こ

れは脱アミド化により負荷電が増加し、たん白質の高次構造がフレキシブルになり、エマルジョンの油液界面で分子内部の疎水基に一部が表面に露出しやすくなり、両親媒構造を形成しやすくなるためと考えられる。

もう一つの重要な起泡性の改変のデータをFig. 3に示した。乾燥加熱による脱アミド化により起泡性が改変され、起泡力で1.5倍に気泡安定性でも2倍以上に上昇した。しかしながら、乳化性の場合と異なり、脱アミド化率が8.2%のpH 5.5で乾燥貯蔵したものは最も優れた起泡性を示し、脱アミド化率の高いpH 10で乾燥貯蔵したものは起泡性の上昇は少なかった。これは気泡膜形成のためには、たん白質分子の分子間相互作用が重要な因子となるが、脱アミド化が進みすぎると負荷電が増加し過ぎることにより、分子間の相互作用が低下するためであると考えられる。

結論として、乾燥下で窒素ガスの存在下での加熱貯蔵により、大豆たん白質の溶解度を損わずに脱アミド化が起り、乳化性や起泡性のような食品機能特性が改変できることが示された。今後、さらに水分活性の低い条件下で、また、徹底した脱酸素の条件下で乾燥加熱を行い、脱アミド化の最適化を検討すべきである。

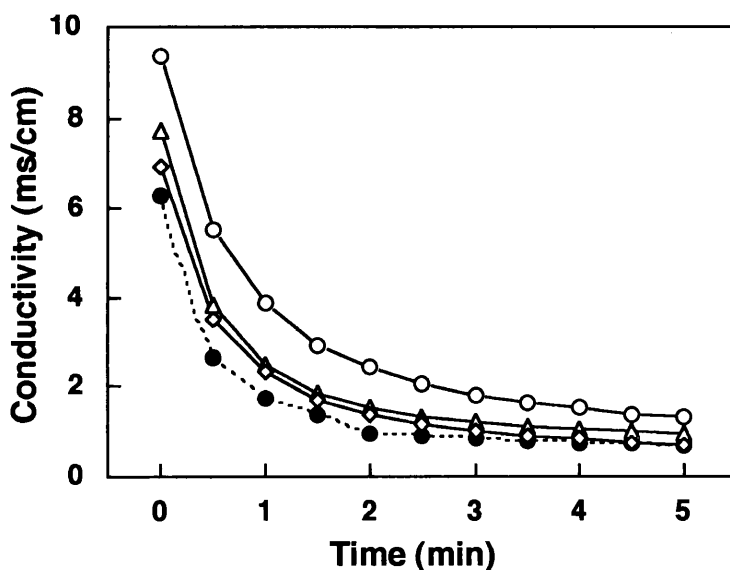


Fig. 3. Forming properties of deamidated APPs.

- native APP
- N₂-APP (7 days)
- △— N₂-APP/pH 8 (7 days)
- ◇— N₂-APP/pH 10 (7 days)

文 献

- 1) Matsudomi N, Sasaki T, Kato A and Kobayashi K (1985) : Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein. *Agric Biol Chem*, **49**, 1251-1256.
- 2) 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.
- 3) Kato A, Tanaka A, Matsudomi N and Kobayashi K (1986) : Deamidation of ovalbumin during s-ovalbumin conversion. *Agric Biol Chem*, **50**, 2375-2376.
- 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) Pearce KM and Kinsella JE (1978) : Emulsifying properties of proteins : Evaluation of a turbidimetric technique. *J Agric Food Chem*, **26**, 716-723.
- 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.