

植物性たん白質のペプチド再構成による高機能化

加藤昭夫*・エルファディル エルフアドル バビキロ・松富直利

山口大学農学部

Improvement of Plant Proteins by the Reconstitution of Peptides

Akio KATO, Elfadil Elfadl BABIKER and Naotoshi MATSUDOMI

Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753

ABSTRACT

The reconstitution of peptide fragments in soy proteins was attempted to improve the functional properties such as solubility, removal of bitterness, emulsifying and foaming properties. Soy protein was reconstituted by microbial transglutaminase treatment of the protease digests or the mild acid hydrolysates. Although the protease digests or the acid hydrolysates of soy protein revealed the insolubility and the bitterness, the subsequent transglutaminase treatment increased the solubility and decrease the bitterness. In addition, the reconstituted soy proteins showed better emulsifying and foaming properties. These results suggest that the reconstitution of peptides using transglutaminase is a useful method for improving food functionality of soy protein. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 49-54, 1997.

Key words : reconstitution of soy protein, transglutaminase treatment, removal of bitterness of peptides

植物性たん白質は一般に溶解度が低く、色素、において、生理的に不都合な化合物などの存在がその高度利用を妨げている。したがって、植物性たん白質を可溶化し、好ましくない化合物を除去した後に、再構成する技術開発がのぞまれている。本研究者らは、小麦グルテンをプロテアーゼや希酸処理によりペプチド化したものをトランスグルタミナーゼを用いて再構成することにより高機能化できること明らかにしてきた¹⁾。今回は大豆たん白質をモデルとして、同様の高機能化ができるかどうかを検討した。その結果、プロテアーゼや希酸処理により加水分解すると不溶性ペプチドが共存するが、トランスグルタミナーゼ処理により可溶

性の高分子複合体に変換された。また、この処理により、大豆ペプチドの苦味の除去や乳化性、起泡性が改善できることが明らかになった。こうして、このトランスグルタミナーゼによるペプチドの再構成により食品たん白質の高機能化が一般的にできることが示された。

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²⁾、大豆たん白質として用いた。

大豆たん白質のプロテアーゼ処理及び酸処理

酸沈澱大豆たん白質のプロテアーゼ処理は基質にた

*〒753 山口市吉田1677-1

いして0.5~1%のプロナーゼ、キモトリプシン、パパイン、ペプシンを加え、各々の酵素の最適 pH で6時間消化後、酵素を失活させ、蒸留水に対して透析し、凍結乾燥した。

大豆たん白質の希酸処理は0.05 N HCl 溶液中で100°Cで1時間加熱後、蒸留水に対し透析し、凍結乾燥した。

大豆たん白質のペプチド断片のトランスグルタミナーゼによる再構成

プロテアーゼ及び酸処理により得られたペプチド断片は微生物 (*Streptoverticillum cinnamomeum* sub sp. *cinnamomeum* IFO12852) 由来のトランスグルタミナーゼにより再構成した。プロテアーゼ及び酸処理ペプチドは重量比で100:1の割合でトランスグルタミナーゼを添加し55°Cで1時間反応させることにより、再構成した。

溶解性の測定

0.2%の凍結乾燥したプロテアーゼ消化物及び酸水分解物にトランスグルタミナーゼを添加し、反応後にOD 500 nm での濁度を測定し、種々の pH での溶解度を調べた。

表面疎水性の測定

表面疎水性の測定は Kato and Nakai のシスバリナリン酸法³⁾で行った。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

スラブ SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli⁴⁾の方法により行った。濃縮用ゲル濃度は5%、分離用ゲル濃度は15%で、20 mA で2時間泳動を行い、ゲルの染色はクマシーブルー R250で行った。

HPLC 分析

TSK ゲル G-3000SW による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、ゲルろ過が行われた。溶出バッファーは0.2 M リン酸ナトリウムで0.1% SDS を含んでいる。流速は0.5 mL/分で行った。

苦味の官能試験

苦味の官能試験は本研究室の学生、院生、教官の中から6名のパネラーを選抜し、苦味の評価は硫酸化キニンの $10^{-4}\%$ から $10^{-3}\%$ の濃度の溶液を基準とし、前者のスコアを1、後者のスコアを9とし9段階のスコアで表示した。

乳化性の測定

再構成大豆たん白質の乳化性は Pearce and Kinsella の方法⁵⁾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12,000 rpm 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

プロテアーゼ及び希酸処理により大豆たん白質はペプチド断片に加水分解されるが、引き続きトランスグルタミナーゼ処理により、高分子化されることが SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から明らかに

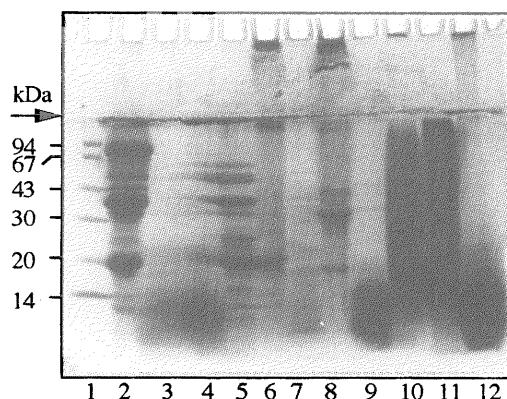


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of acid precipitated soy protein (APP) digested by protease or acid treatments followed by transglutaminase (TGase) treatment. (1), Molecular marker; (2), APP; (3), Pronase digests; (4) Pronase digests + TGase; (5), Chymotrypsin digests; (6), Chymotrypsin digests + TGase; (7), Papain digests; (8), Papain digests + TGase; (9), Pepsin digests; (10), Pepsin digests + TGase; (11), HCl hydrolysates; (12), HCl hydrolysates + TGase. Arrows indicate the boundary between the stacking (upper) and separating (lower) gels.

なった (Fig. 1). 図に示されているように、濃縮用ゲルに入りきらないほど高分子量のバンドの存在することがわかる。この高分子化は HPLC でも確認され (Fig. 2), 低角レーザー光散乱法で分子量一千万以上であることが示された。興味深いことに、このように大豆たん白質のペプチドの再構成により、高分子化するにもかかわらず、溶解性は増加した。Table 1 に示すように、プロテアーゼ処理や希酸処理により、溶解度は著しく低下する。これはペプチド断片化により、疎水ペプチドが露出するものと予想される。この懸濁液にトランスグルタミナーゼを加えると、ほぼ透明になった。この現象はペプチド化により分子表面に疎水基が出現するが、トランスグルタミナーゼにより、疎水基が再構成分子内部に埋められると考えると説明しやすい。

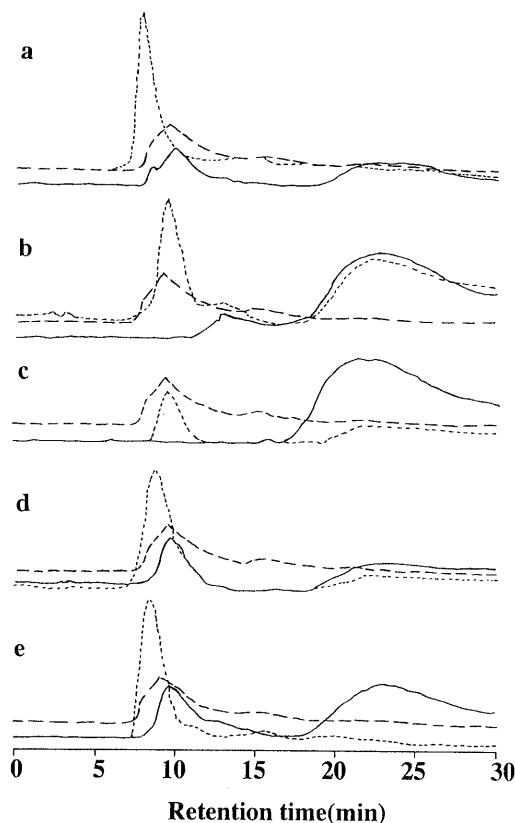


Fig. 2. Elution patterns by HPLC of APP (—), chymotrypsin digest(a), pronase digest(b), acid hydrolysate(c), pepsin digest(d) and papain digest(e) with (.....) and without (——) TGase treatment.

実際に、表面疎水性を測定した結果を Table 2 に示した。予想どおりに、ペプチド化により表面疎水性は 1.5~2.2 倍に増加するが、トランスグルタミナーゼ処

Table 1. Effect of TGase treatment on the solubility of protease digests and acid hydrolysate of soy protein in distilled water

Samples	Turbidity (OD500)	
	TGase -	TGase +
APP	0.56±0.02	—
Pronase digest	1.50±0.04	0.02±0.003
Chymotrypsin digest	2.20±0.12	0.01±0.001
Papain digest	2.18±0.08	0.01±0.002
Pepsin digest	0.65±0.03	0.02±0.003
Acid hydrolysate	0.70±0.02	0.01±0.001

Values are means ± SD, n = 3.

Table 2. Effect of TGase treatment on surface hydrophobicity (So) of protease digests and acid hydrolysate of soy protein

Samples	So	
	TGase -	TGase +
APP	17.07±1.20	—
Pronase digest	25.80±3.87	3.63±1.39
Chymotrypsin digest	24.00±2.88	1.17±0.21
Papain digest	25.00±1.98	1.24±0.13
Pepsin digest	25.85±0.76	1.60±0.01
Acid hydrolysate	37.63±1.36	2.40±0.80

Values are means ± SD, n = 3.

Table 3. Bitterness scores of protease digests and acid hydrolysate of soy protein with and without TGase treatment

Samples	Bitterness score (quinine sulfate equivalent, ×10 ⁻³ %)	
	TGase -	TGase +
Chymotrypsin digest	6.50±0.25	1.04±0.02
Papain digest	6.40±0.36	1.12±0.13
Pepsin digest	7.80±0.91	1.21±0.07
Pronase digest	4.13±0.31	1.07±0.05
Acid hydrolysate	7.60±0.42	1.13±0.12

Values are means ± SD, n = 6.

理により、その値は激減し、10分の1以下の値を示している。同様の考察が苦味のデータからも推測される。通常、たん白質をプロテアーゼで加水分解すると疎水性ペプチドによる苦味を生じるために、この苦味除去のために、さらに特殊なペプチダーゼで処理するなどの方策が採られているが、トランスグルタミナーゼ処理により、疎水ペプチドが再構成分子内部にシールされるために、苦味の除去が期待される。Table 3に示すように、ペプチド化により生じる苦味はトランスグルタミナーゼ処理により完全に消失することが明らかになった。

Fig. 3はこうして得られた再構成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、プロテアーゼ及び酸処理によりペプチド化した大豆たん白質の

乳化性は未処理のものに比べ、大きな改変は認められないが、トランスグルタミナーゼによる再構成により著しく改変される。これは高分子化した再構成分子がエマルジョンの油滴の表面を覆うのに効果的であることを示している。食品たん白質の乳化性を支配する構造因子として両親媒構造をとるための表面疎水性³⁾、構造のフレキシビリティ⁷⁾に加え、分子の大きさも重要な因子であることを示す結果である。

最後に、もう一つの重要な機能である起泡性の改変のデータをFig. 4に示した。図に示したように、未処理大豆たん白質の起泡性は低いが、ペプチドの再構成により起泡性もまた改変されることが示された。食品たん白質の起泡性を支配する構造因子として、構造のフレキシビリティ⁷⁾、分子の大きさ⁸⁾が重要な因子で

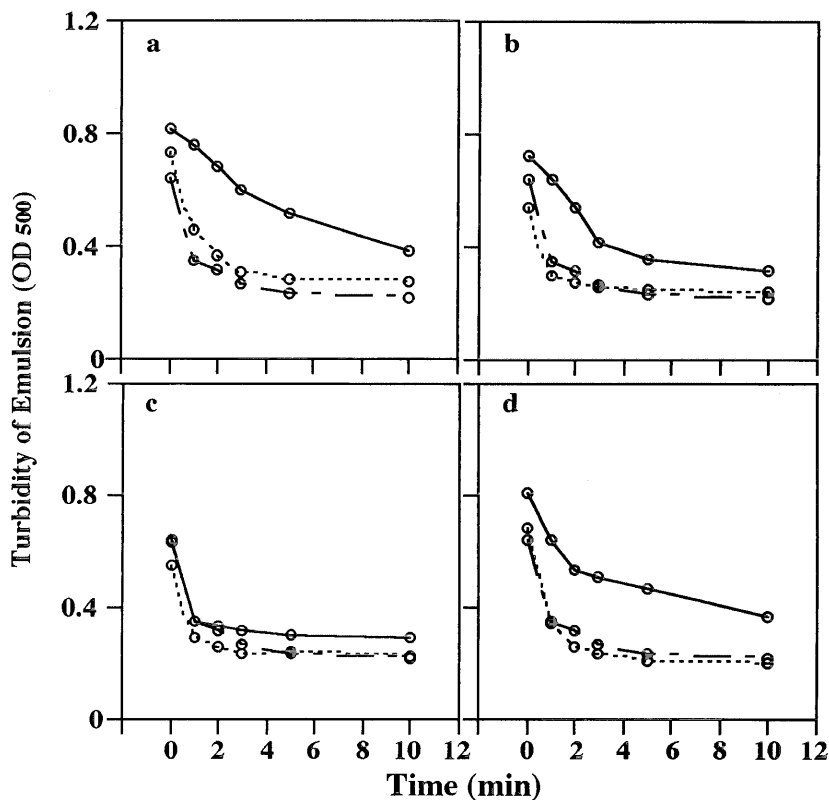


Fig. 3. Emulsifying properties of acid precipitated soy protein (APP) (—) and APP treated with Chymotrypsin (a), Pepsin (b), Pronase (c) or 0.05 N HCl (d) with (—) and without (-----) transglutaminase treatment. Values are means of duplicate samples.

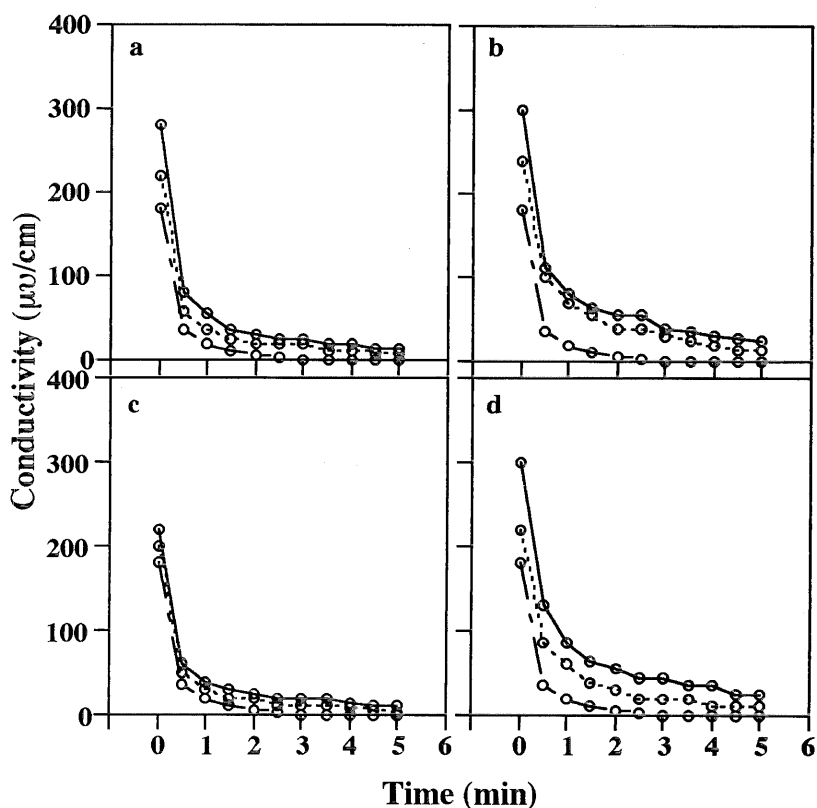


Fig. 4. Foaming properties of acid precipitated soy protein (APP) (—) and APP treated with Chymotrypsin (a), Pepsin (b), Pronase (c) or 0.05 N HCl (d) with (—) and without (.....) transglutaminase treatment. Values are means of duplicate samples.

あることが報告されており、この結果はこれら報告を裏付けるデータである。すなわち、気泡膜を安定化するのに大きな分子ほど寄与することを示している。

結論として、大豆たん白質のペプチド断片化後にト

ランスグルタミナーゼで再構成することにより、溶解性、苦味除去、乳化性、起泡性などの食品としての機能特性が改変できることが示された。

要 約

大豆たん白質のプロテアーゼ消化物をトランスグルタミナーゼ処理することにより、その苦味が消失し、乳化性、気泡性などの機能性も改変できることが明らかになった。これらの結果は、たん白質のペプチド断片をトランスグルタミナーゼで再構成することが、食品たん白質の高機能化の有用な手法であることを示している。

文 献

- 1) Babiker EE, Fujisawa N, Matsudomi N and Kato A (1996) : Improvement in the functional

properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial trans-

- glutaminase treatment. *J Agric Food Chem*, **44**, 3746-3750.
- 2) 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.
 - 3) Kato A and Nakai S (1980) : Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim Biophys Acta*, **624**, 13-20.
 - 4) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 980-985.
 - 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.
 - 7) Kato A and Yutani K (1988) : Correlation of surface properties with conformational stabilities of wild-type and six mutant tryptophan synthase α -subunits substituted at the same position. *Protein Engineering*, **2**, 153-156.
 - 8) Kato A (1991) : Significance of macromolecular interaction and stability in functional properties of food proteins. In : *Interaction of Food Proteins*. Parris N and Barford R, eds., *ACS Symposium Series*, **434**, pp. 13-24.