

乾燥卵白を用いた大豆たん白質の溶解度向上とその機能特性解析

下山田 真^{*1,2}・岩崎 文¹・山内 亮¹

¹岐阜大学応用生物科学部 ²現, 宮城大学食産業学部

Increased Solubility of Soybean Protein by Dried Egg White and Its Functional Property

Makoto SHIMOYAMADA^{1,2}, Aya IWASAKI¹ and Ryo YAMAUCHI¹

¹Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu 501-1193

²School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University, Sendai 982-0215

ABSTRACT

Dry-heating, namely heat treatment under very low water content, was reported to improve functional properties of egg white. In this study we applied dry-heating to soybean proteins. However, acid precipitated protein (APP) of soybean was insolubilized by dry-heating. In the previous papers, egg white ovalbumin was reported to allow ovotransferrin to solubilize even after the dry-heating. So we investigated the solubilization of APP with egg white. When APP, which was extracted from defatted soybean seeds with distilled water at 30°C, was mixed with egg white, it was highly solubilized even after the dry-heating. From SDS-PAGE patterns, especially α - and α' -subunits of β -conglycinin of the APP were partially hydrolyzed. Chymotryptic hydrolysis of APP showed comparable solubility after the dry-heating. From gel filtration chromatograms of the dry-heated APP, partial hydrolysis of APP suppressed aggregate formation and resulted in insolubilization. Further, the dry-heated APP, which was previously hydrolyzed by chymotrypsin and mixed with egg white was subjected to heat-induced gel formation. The resulting gel was a harder gel compared to non-treated APP gel and softer than dry-heated APP gel. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 39-43, 2005.

Key words : soy protein, dry-heating, solubility, protease, egg white

以前に卵白を乾燥粉末として80°Cで長時間加熱処理することにより機能特性の向上することが報告されて

いる¹⁾. 我々のグループではこうした乾熱処理について見直し, 120°Cという高温条件下にて数時間の乾熱処理を行うことでたん白質溶解性の維持, ゲル物性の向上などが図られることを見いだしている^{2~4)}. しか

*〒982-0215 仙台市太白区旗立2-2-1

しながら、乾熱処理を大豆たん白質に適用すると不溶化が進行し、大豆食品への応用は難しいことがわかった。そこで、乾燥卵白においてオボアルブミンが熱感受性たん白質であるオボトランスフェリンの熱凝固を阻止する現象に着目し⁴⁾、あらかじめ乾燥卵白を添加した大豆たん白質を乾熱処理することによる溶解度の維持について検討することとした。得られた結果より溶解度を保つための条件、要因について考察するとともに、乾熱処理大豆たん白質のゲル形成性について検討した。

実験方法

大豆酸沈殿たん白質 (APP) の調製

ヘキサンで脱脂した大豆粉に10倍量の0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.6) あるいは蒸留水を加えて、2時間攪拌抽出を行なった。その後、遠心分離 (6,500 rpm, 20 min) し、その上清をpH 4.5に調整後、再び遠心分離 (10,000 rpm, 20 min) を行なった。得られた沈殿物は、2-メルカプトエタノールを数滴添加した同リン酸緩衝液に溶解させ、透析後、凍結乾燥して酸沈殿たん白質 (APP) とした。

APPのプロテアーゼ処理

脱脂大豆から蒸留水にて抽出、調製したAPP画分にプロテアーゼとしてキモトリプシンを加え、37℃で反応後、凍結乾燥した。

乾熱処理

APP、乾燥卵白、APPと乾燥卵白の混合物をガラスビンに50 mgずつ秤りとり、フタをせずに120℃で6時間乾熱処理した。その後すばやく試料をデシケータに移し、室温まで冷却した。

たん白質の定量

たん白質の定量はLowry法⁵⁾にて行なった。

加熱ゲルの調製と破断試験

大豆たん白質試料80 mgを、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.6) 0.5 mLに溶かした。これをマイクロチューブに分注し、90℃、30分間加熱した。加熱後は、4℃で一晩保った。室温に戻したサンプルをレオメーターに供して、応力-歪曲線を求めた。圧縮率は98%とし、プランジャーの移動速度は1 mm/sとした。

ゲルろ過クロマトグラフィー

試料を0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.6) に溶解させた後、Sephacryl S-300カラムに供し、同緩衝液にて溶出させた。溶出液は100滴ずつ集め、280 nmでモニタリングした。

電気泳動

たん白質の組成分析はLaemmli⁶⁾の方法に従い、SDS-PAGEにて行った。

結果と考察

大豆酸沈殿たん白質を乾熱処理した際の溶解度変化と乾燥卵白添加の影響

これまでに我々の研究室において乾燥卵白を高温で加熱処理すると、種々の物性改善がみられることを報告している。そこでこの乾熱処理をAPPに適用することとした。その結果、APPを120℃で乾熱処理するとFig. 1 (折れ線グラフ) に示したように乾熱処理時間の増加とともに溶解度は低下し、6時間の乾熱処理によってその溶解度は14%にまで低下することがわかった。

乾燥卵白を乾熱処理するとその溶解度はほぼ100%保たれることが既にXuらによって報告されている²⁾。卵白中には熱感受性の高い成分であるオボトランスフェリンが存在するが、卵白中のメイン成分であるオボアルブミンがオボトランスフェリンの熱凝固を抑制している⁴⁾。そこで、APPに乾燥卵白を加えて溶解し、可溶化した画分について凍結乾燥後に乾熱処理することとした。その結果、乾燥卵白無添加サンプルと比較して溶解度の向上はみられたもののその溶解度は乾熱処理を行っていないAPPと比較すると低いものであった (Fig. 1, 棒グラフ)。

大豆たん白質の場合、卵白と異なり、調製時に抽出という操作が必須であるため、APPの抽出方法を種々検討し、得られた画分について乾熱処理後の溶解度変化について調べることにした。その結果、緩衝液よりも蒸留水を用いて抽出の方が乾熱処理後の溶解度は

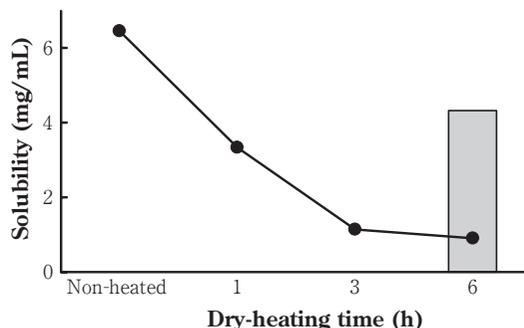


Fig. 1. Effect of dry-heating and egg white on solubility of soybean protein (APP). Line graph, solubility of APP with no egg white; Bar graph, APP with Egg white.

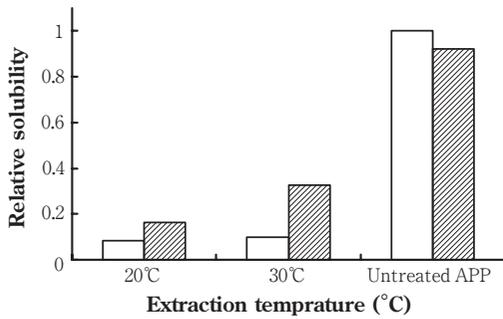


Fig. 2. Solubilities of APP extracted from soybean with various conditions. Open bar, extracted with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6); Hatched bar, with distilled water.

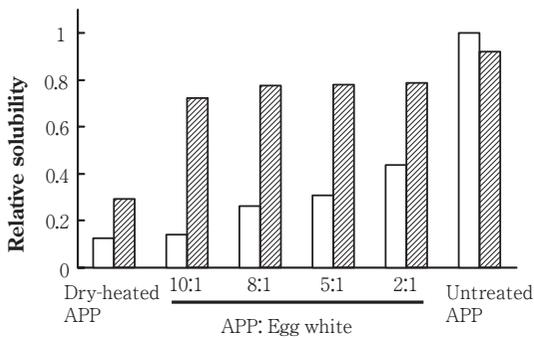


Fig. 3. Effect of egg white on solubility of dry-heated APP. APP was extracted from defatted soybean meal at 30°C. Open bar, extracted with buffer; Hatched bar, with distilled water.

高く、特に30°Cで抽出すると未処理APPの10%程度であった乾熱後の溶解度が35%程度にまで増加することが示された (Fig. 2)。

そこで、このAPPに乾燥卵白を添加し蒸留水に溶解し、得られた上清画分を凍結乾燥後、乾熱処理に供した。その結果、緩衝液で抽出したAPPの場合には2分の1量の卵白を添加しても乾熱後の溶解度は未処理APPの40%程度しか示さなかったのに対して蒸留水で抽出したAPPでは10分の1量の添加でも85%と高い溶解度を示すことがわかった (Fig. 3)。

この両画分を電気泳動に供してたん白質の組成分析を行った結果、緩衝液で抽出した画分では大豆たん白質を構成する各サブユニットのバンドが観察されたのに対して蒸留水で抽出した画分では特にβ-コングリシニンを構成する各サブユニットにおいて部分的な分解がみられ、α'-サブユニットはほとんど検出されなかった (Fig. 4)。こうしたたん白質の部分分解は大豆脱

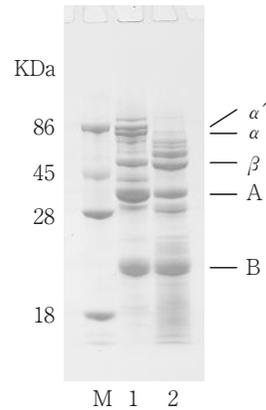


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of APP fraction extracted from soybean at 30°C. M, Molecular marker; 1, APP extracted with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6); 2, APP extracted with distilled water. α', α, β, α', α- and β-subunits of β-conglycinin; A, B, Acidic (A) and basic (B) polypeptides of glycinin.

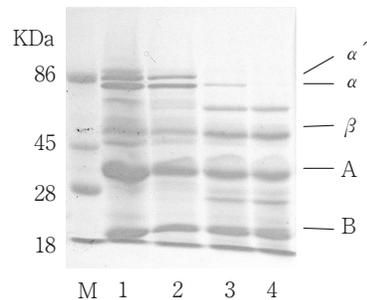


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of chymotryptic hydrolyzed APP. M, molecular marker; 1, Untreated APP; 2, Chymotrypsin treated APP (1/400); 3, 1/200; 4, 1/100.

脂粉を30°Cという比較的高温で抽出したために、抽出時に内在性あるいは微生物由来のプロテアーゼが作用してたん白質の一部が分解されたものと考えられた。

APP/乾燥卵白混合物を乾熱処理した後の溶解度に及ぼすプロテアーゼ処理の影響

以上のように蒸留水を用いて高温下で抽出した大豆たん白質が乾熱処理後も比較的高い溶解度を保つことが示され、その要因としてたん白質の部分分解が考えられた。そこで、常法に従って抽出したAPPをプロテアーゼ処理し、乾熱後の溶解度を比較することとした。プロテアーゼとしては疎水性部分を切断することでたん白質間の相互作用は弱まるものと思われ、キモトリプシンを用いた。

APPをキモトリプシン処理した画分について電気泳

動によってたん白質の分解程度を確認した。その結果、400分の1量の添加では β -コングリシニン由来のサブユニットのバンドが未処理APPとほぼ同様に検出されたのに対して200分の1では α' -サブユニットはほとんど検出されず α -サブユニットがわずかに検出され、100分の1では両サブユニットのバンドがほとんど検出されないことが確認できた (Fig. 5)。そこで、おのおのキモトリプシン処理画分に乾燥卵白を添加後、乾熱処理に供して溶解度変化を測定した。その結果、400分の1量のキモトリプシンを添加した試料ではデータには示さなかったものの溶解度の向上はほとんど見られなかった。キモトリプシンの添加量を200分の1、100分の1と増加させるにつれて乾熱処理後の溶解度は上昇し、未処理の70%程度と高温、蒸留水抽出したAPPと比較しうる程度の溶解度となった (Fig. 6)。

こうしたプロテアーゼ処理による乾熱処理後の溶解度の上昇の要因について検討するために乾熱処理したたん白質試料をゲル濾過に供して分析することとした。その結果、常法に従って抽出したAPPと乾燥卵白を混合した場合と比較して、プロテアーゼ処理したAPPと乾燥卵白を混合したものを乾熱処理した試料ではより低分子画分の溶出物の量が増加していることが示され、凝集体の形成が抑制されているものと予想された (Fig. 7)。

乾熱処理したAPPから調製した加熱ゲルの力学物性

以上のようにして得られた乾熱処理たん白質画分の有効性について検討するために本課題では加熱ゲルを調製しその力学物性として歪み-応力曲線を求めた。その結果、乾燥卵白を添加せずに乾熱処理したAPPはより硬く、もろい加熱ゲルを形成したのに対し、キモトリプシン処理APPから得られた加熱ゲルは破断強度、破断歪みが未処理APPから得られたゲルと乾熱APPとの中間的な値を示し、さらに乾燥卵白を添加したキモトリプシン処理APPから得られた加熱ゲルは破断歪みが未処理APPとほぼ同様で破断強度のみが高まっており、それぞれ力学物性の異なるゲルを形成していることが示された (Fig. 8)。特にキモトリプシン処理した後に乾燥卵白を添加したAPPでは破断歪み率が維持されたままで破断強度が上昇していることから溶解度の上昇によってゲルネットワークの均一性が高まっているのではないかと推測された。

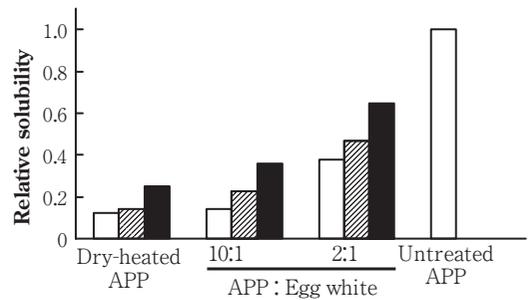


Fig. 6. Solubility of dry-heated APP with egg white after chymotryptic hydrolysis. APP was partially hydrolyzed by chymotrypsin before mixing with egg white. The mixture of APP and Egg white was dry-heated at 120°C, 6 h. Open bar, No chymotrypsin was added to APP; Hatched bar, 1/200 of chymotrypsin was added; Closed bar, 1/100 of chymotrypsin was added.

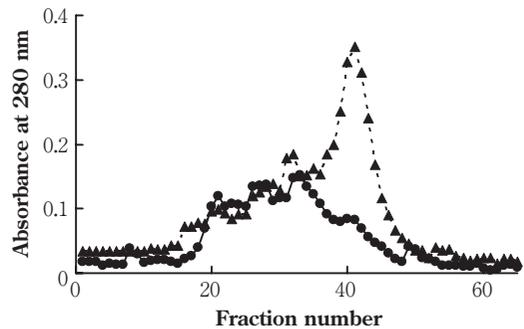


Fig. 7. Gel filtration chromatograms of dry-heated APP/egg white mixture (2:1). Closed circle and solid line, APP; Triangle and dotted line, Chymotrypsin treated APP. Each sample was subjected to Sephacryl S-300 column.

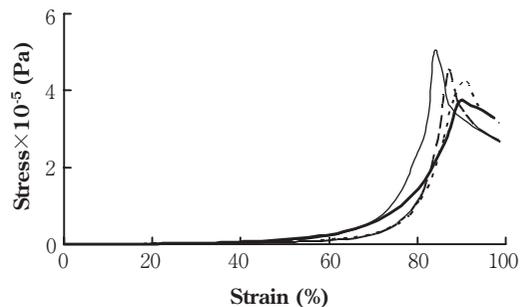


Fig. 8. Stress-strain curves of heat-induced gel from dry-heated APP. Bold line, No dry-heated APP; Dashed line, Dry-heated APP (chymotrypsin treated); Dotted line, Dry-heated APP (chymotrypsin treated); Egg white (10:1); Fine line, Dry-heated APP.

要 約

卵白粉末を乾燥下にて高温で加熱処理するとその機能特性の向上することが示されているためにこの乾熱処理を大豆たん白質へ適用する方法について検討した。大豆酸沈殿たん白質画分（APP）は卵白たん白質とは異なり、単独で乾熱処理に供すると著しく不溶化を起こしたので、卵白中のオボアルブミンがオボトランスフェリンの不溶化を強力に抑制することに着目して乾燥卵白を添加したAPPを乾熱処理することとした。種々条件を検討した結果、APP画分そのものは乾燥卵白によって乾熱処理後の溶解度が上昇するものの乾熱処理していないAPPと比較すると低い値となった。しかしながら抽出に蒸留水を用い、30℃という比較的高温下にて抽出したAPP画分は乾熱処理後も高い溶解度を示すことがわかった。電気泳動の結果よりこの可溶化の要因として β -コングリシニンサブユニットの部分分解が予想された。そこで、APPをあらかじめキモトリプシンで処理した後に乾燥卵白を添加して乾熱処理したところ、高温下にて抽出した部分分解APPと比較しうる程度の溶解性を示した。この画分をゲル濾過に供した結果、低分子量画分に多くの溶出物が見られ、乾熱時の凝集体形成が抑制されることで不溶化が抑制されているものと推測された。特に、キモトリプシンによる部分分解によって溶解度が高まったことから凝集体形成の要因としてたん白質間の疎水の相互作用が予想された。得られた乾熱処理試料より加熱ゲルを作製した結果、乾燥卵白を加えて加熱ゲルを形成することでゲルの硬さが増すことがわかり、大豆たん白質から調製する食品素材のレオロジー的性質を制御する上で有効であるものと考察された。

文 献

- 1) Kato A, Ibrahim HR, Watanabe H, Honma K and Kobayashi K (1990): Structural and gelling properties of dry-heated egg white proteins. *J Agric Food Chem*, **38**, 32-37.
- 2) Xu JQ, Shimoyamada M and Watanabe K (1998): Heat aggregation of dry-heated egg white and its inhibiting effect on heat coagulation of fresh egg white. *J Agric Food Chem*, **46**, 3027-3032.
- 3) Watanabe K, Xu JQ and Shimoyamada M (1999): Inhibiting effects of egg white dry-heated at 120°C on heat aggregation and coagulation of egg white and characteristics of dry-heated egg white. *J Agric Food Chem*, **47**, 4083-4088.
- 4) Watanabe K, Nakamura Y, Xu JQ and Shimoyamada M (2000): Inhibition against heat coagulation of ovotransferrin by ovalbumin dry-heated at 120°C. *J Agric Food Chem*, **48**, 3965-3972.
- 5) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- 6) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.