

水溶性大豆多糖類による大豆たん白質ゲルの物性改変

松村康生*¹・山口ひとみ¹・李 俊²

¹京都大学大学院農学研究科 ²中国農業科学院飼料研究所

Effects of Soluble Soybean Polysaccharides Addition on Gelling Behavior of Soy Proteins

Yasuki MATSUMURA¹, Hitomi YAMAGUCHI¹ and Jun LI²

¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

²Institute of Feed Research, China Science Academy of Agriculture

ABSTRACT

Effects of SSPS addition on the gelation behavior of 11S globulin under the high ionic strength condition were investigated. With the increase in SSPS concentration, the rupture stress of 11S globulin gel decreased. It was demonstrated by DSC measurement that the thermal stability of 11S globulin molecule was enhanced by SSPS. SDS-PAGE analyses revealed that the polymer formation via disulfide linkage of 11S globulin was inhibited by SSPS. The retardation of gelling of 11S globulin by SSPS was demonstrated using dynamic oscillation measurement. The observation of gel microstructure by scanning electron microscopy showed that the network structure of 11S globulin gel was destroyed by SSPS addition. These results indicate the inhibition of gelling process of 11S globulin by SSPS. However, the storage modulus of 11S globulin gel was found to rise by SSPS addition based on the results of dynamic oscillation measurement. Furthermore, the gigantic polymers of 11S globulin were observed in the micrograph image of mixed gel system of 11S globulin and SSPS instead of the typical network structure of protein gel. This means SSPS could modify the structure and physical properties of 11S globulin gel, thereby producing the new type gel. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 34-39, 2007.

Key words : soluble soybean polysaccharides, soy protein, 11S globulin, gelation

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

大豆たん白質はアミノ酸バランスに富み、コレステロール低下作用を示すなど栄養学的・生理学的に非常に優れたたん白質である¹⁾。また、大豆たん白質は、ゲル化能を有することから²⁾、その性質を利用して豆腐の製造が古くから行われてきた。さらに現在では、大豆たん白質を含むゲル状食品の開発も盛んに進められている。

たん白質を含むゲル状食品に求められる物性は、現代では非常に多様なものとなっている。例えば、介護用食品やスポーツ栄養食品において、必要な量のたん白質を含みながら、固いゲルを形成せず、ある程度の流動性を保つような物性が求められている。そのような物性を作り出すために、しばしばテクスチャーモディファイヤーが添加される³⁾。最も多く用いられるテクスチャーモディファイヤーは多糖類であり、多糖類とたん白質混合系ゲルの研究は、現在非常に重要なテーマの一つとなっている⁴⁾。

昨年度の本研究会で、私達は、水溶性大豆多糖類(SSPS)が、大豆たん白質の酸性領域における分散安定性を向上させること、しかもその効果がペクチンより優れていることを報告した⁵⁾。この結果は、大豆たん白質とSSPSの相互作用を示唆している。本年度は、大豆たん白質の主要成分である11Sグロブリンを対象とし、そのゲル化挙動に対して、SSPSが与える効果について検討した。

方 法

実験材料および試薬類

11Sグロブリンは脱脂大豆より、Naganoらの方法⁶⁾により調製した。SSPS(製品名:ソヤファイブ-S-DA100)は、不二製油株式会社より供与いただいた。その他の試薬は、和光純薬社製のものを用いた。

11SグロブリンとSSPS混合液の調製

11SグロブリンとSSPSはリン酸緩衝液(35 mM リン酸ナトリウム, 0.4 M NaCl, pH7.6, イオン強度0.5)にそれぞれ溶解した後、混合した。11Sグロブリンの混合液中の濃度は、2.5%から15%の範囲に設定した。また、SSPSと11Sグロブリンの比率は、重量比で0から0.6の間に設定した。

加熱ゲルの形成および破断強度の測定

上記の方法で調製した混合液を100℃で30分間加熱することによりゲルを形成した。形成したゲルの圧縮試験を、山電(株)製のレオナー(RE-3305)を用いて行った。

ゲル化過程の解析

11SグロブリンとSSPSの混合液を対象とし、以下の

方法によって、その加熱ゲル化過程について検討した。まず、セイコー電子工業社製の示差走査熱量計(DSC)測定により、11Sグロブリンの熱変性挙動を分析した。次に、SDS-PAGE法により、加熱による11Sグロブリンの重合体形成の程度を評価した。さらに、ユービーエム(株)製の粘弾性測定装置(Rheosol-G3000)により、混合液の貯蔵弾性率の加熱・冷却操作による変化を追跡した。

微細構造の観察

ゲルの微細構造は日立社製の走査型電子顕微鏡装置(S-4500)を用いて観察した。

結 果

11Sグロブリンゲルの破断強度に及ぼすSSPSの添加効果

様々な濃度の11Sグロブリン溶液とSSPSの混合液を加熱しゲルを形成した。ゲルの破断強度を圧縮試験により求めた。Fig. 1に15%11Sグロブリンゲルの応力-歪曲線の結果を示す。SSPS無添加の場合には、明確な破断点が観察され、その応力は約84 kPasであった。SSPSの添加量を上昇させるとともに、その破断強度は減少し、SSPSと11Sグロブリンの比率が6:10添加の場合には、明確な破断点が観察されなかった。他のたん白質濃度の場合でも同様に、SSPSは11Sグロブリンゲルの破断強度を減少させる傾向が認められた。以上の結果から、SSPSは11Sグロブリンのゲル化を阻害することが示唆された。

11Sグロブリンのゲル化過程に及ぼすSSPSの添加効果

前項でSSPSの添加は11Sグロブリンのゲル化を阻害することが明らかとなった。そのメカニズムを探るため、本項では11Sグロブリンのゲル化過程に対するSSPSの添加効果を種々の方法で検討した。

まず、熱変性に及ぼす効果を検討するため、DSC測定を行った。Fig. 2にその結果を示す(11Sグロブリン5%溶液)。SSPS無添加・添加いずれの場合にも、単一の吸熱ピークが認められ、熱変性が生じていることが示された。そのピークの位置はSSPSの添加により高温側にシフトした。すなわち、無添加の場合には、101.8℃であったのに対し、SSPSを11Sグロブリンと同量加えた場合には、104.2℃にまで上昇していた。以上の結果から、SSPSは11Sグロブリンの熱安定性を高めることが明らかとなった。

次にSDS-PAGEにより、加熱による11Sグロブリンの重合体の形成に対するSSPSの効果を観察した。その結果をFig. 3に示す。この場合、還元剤を泳動時に

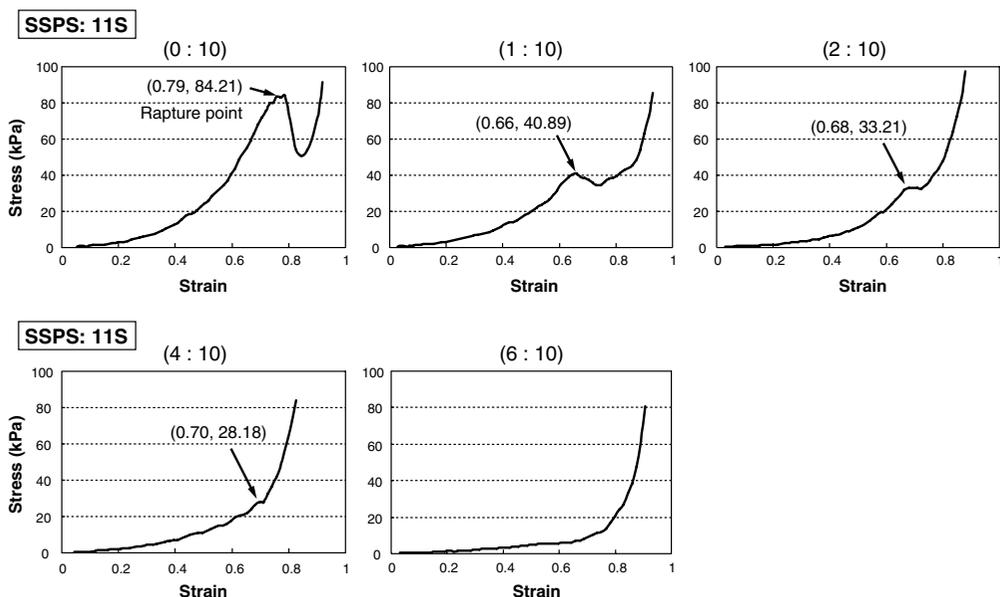


Fig. 1. Effects of SSPS addition on stress-strain curve of 11S globulin gel. Mixture of solutions of 11S globulin and SSPS were heated at 100°C for 30 min to form gels. The concentration of 11S globulin was 5%, and the ratio of SSPS and 11S globulin was changed from 0 to 0.6. The compression test was carried out to obtain the stress-strain curve of gels. The strain and stress at the rapture point were shown in each figure.

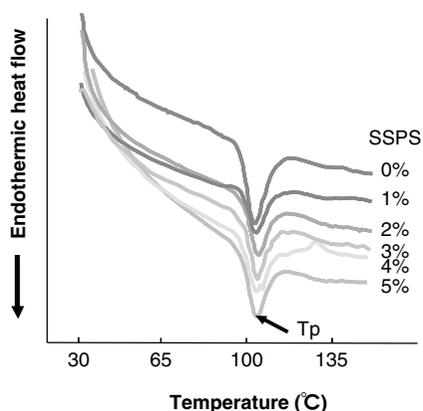


Fig. 2. Effects of SSPS addition on DSC curve of 11S globulin solution. The concentration of 11S globulin was 5%. The concentration of SSPS was shown in the figure. Tp means the temperature at the top position of endothermic peak in each curve.

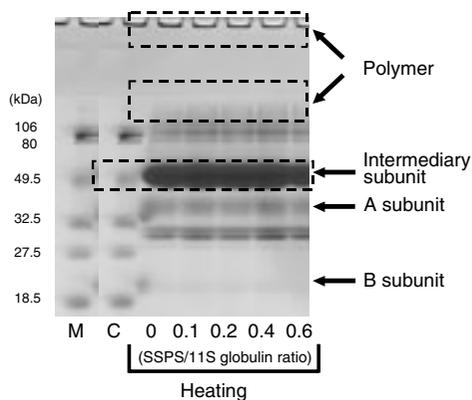


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of 11S globulin polymer formed by heating in the presence or absence of SSPS. Mixture of solutions of 11S globulin (1%) and SSPS (0-0.6%) were heated at 100°C for 5 min. The solutions were mixed with SDS-buffer containing no reducing agent. The electrophoresis was carried out in the *Laemmli* system without reducing agent. "M" means the lane of molecular weight marker. "C" means that of 11S globulin without heating treatment. Patterns of 11S globulin and SSPS mixture solutions after heating are shown in lanes "Heating". SSPS/11S globulin ratio of heating solution is shown in the number of each lane.

使用していないので、ジスルフィド結合を介した重合体の形成が確認できる。未加熱の場合には、11Sグロブリンの中間サブユニットが観察された。しかし、加熱されることにより、中間サブユニットが減少するとともに、新たに重合体の画分（分離ゲルや濃縮ゲルの

上部に観察される)が生成した。SSPSの添加濃度を上昇させると、重合体の生成量が減少するとともに、中間サブユニットの残存量が増加していた。この結果から、加熱により誘導される11Sグロブリンのジスルフィド結合を介した重合体形成が、SSPS添加により抑制されることが示された。

次に、動的粘弾性測定により、加熱による物性変化を検討した。すなわち、様々な比率でSSPSと混合した11グロブリン溶液(5%)を、30℃から、毎分5℃の割合で100℃にまで昇温させ、10分間100℃で保持後、再び30℃にまで冷却する間の貯蔵弾性率(G')の変化を観察した。Table 1にゲル化時間(G' が急激な立ち上がりを見せた点の時間)と加熱冷却後の最終の G' 値の結果を示す。SSPSの添加量の増大とともに、ゲル化時間は大きくなった。すなわち、SSPSは11グロブリンのゲル化を遅延する効果が認められた。その一方で、最終の G' はSSPSの添加量の増加に応じて、大きくなることが示された。この結果は、前項の圧縮試験の結果、すなわちSSPS添加により破断強度が低下するという結果と、一見矛盾する。

以上の結果、SSPSは初期段階から最終段階に至る全ての過程で11Sグロブリンのゲル化を妨げていることが明らかとなった。しかし、ゲル形成後の G' を増加させるなど、11S単独のゲルとは異なったタイプの物性をもたらすことも示された。

微細構造観察

Fig. 4に11Sグロブリンゲルの微細構造の、走査型電子顕微鏡による観察結果を示す。上が12.5%、下が

5%の結果である。SSPS無添加の場合には、たん白質ゲルによく見られる、発達したネットワーク構造が観察される。しかし、SSPSを添加してゆくと、そのネットワーク構造が破壊され、もっともSSPS添加量が高い場合には、巨大な繭上の会合体が観察された。なお、共焦点レーザー顕微鏡による観察結果から、このような会合体と会合体の間のスペースは、SSPSによって埋められていることが確かめられた。

Table 1. Effects of SSPS addition on gelling time (T_{gel}) and final value of storage modulus (G'_{final}) of 11S globulin solution

SSPS concentration (%)	T_{gel} (sec)	G'_{final} (kPa)
0	1,760	1.60
1	1,840	1.48
2	1,780	3.50
3	1,840	4.93
4	1,820	8.10
5	1,940	6.45

11S globulin concentration of solution was 5%. T_{gel} and G'_{final} were obtained by dynamic oscillatory measurement of G' of 11S globulin solution in the absence or presence of SSPS. The heating- and cooling-treatment for the measurement was carried out as follows; 11S globulin solution was heated from 30℃ to 100℃ in the rate of 5℃/min and kept at 100℃ for 10 min, thereafter cooled again to 30℃. T_{gel} is the temperature inducing the onset of rapid increase in G' . G'_{final} is the value of storage modulus after heating- and cooling-treatment.

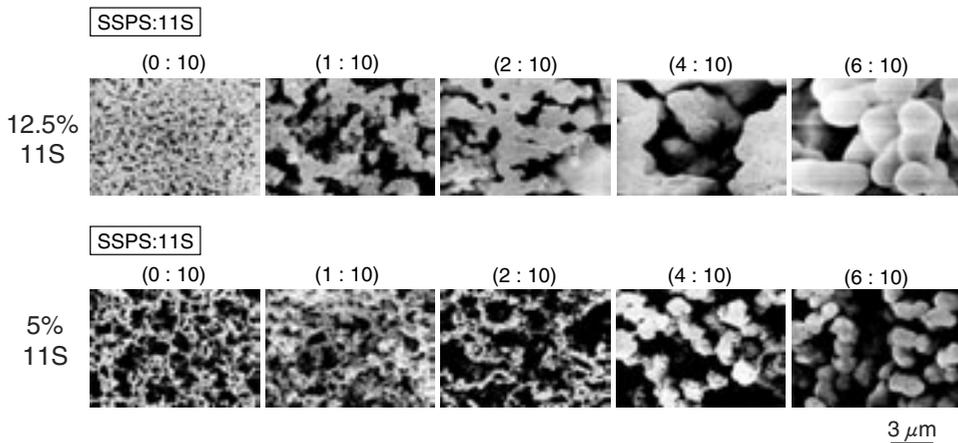


Fig. 4. Scanning Electron Micrograph of 11S globulin gels in the presence or absence of SSPS. The upper and bottom figures show the image of 12.5% and 5% 11S globulin gels, respectively. The ratio of SSPS and 11S globulin was shown in parenthesis.

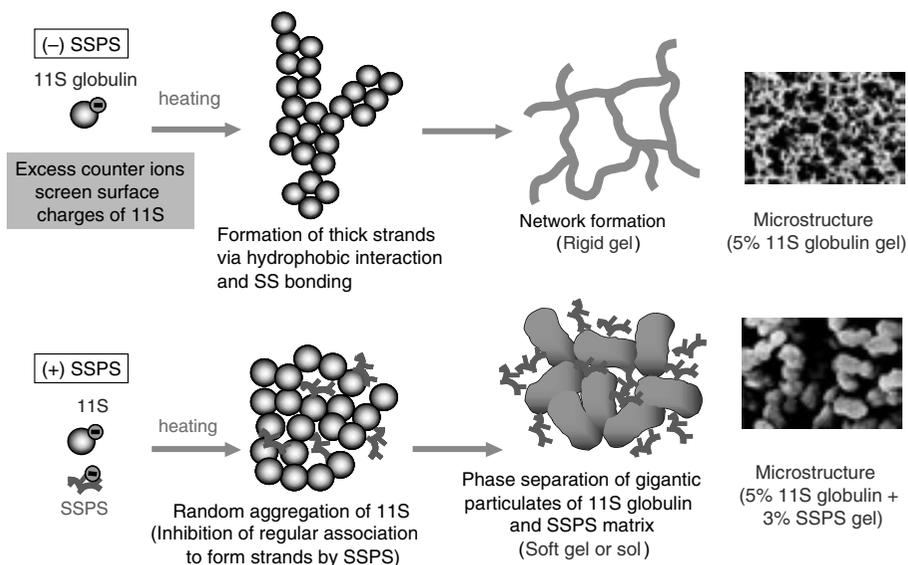


Fig. 5. Schematic representation of gelation of 11S globulin in the presence or absence of SSPS. The upper figure shows the case of 11S globulin gelation in the absence of SSPS. In the bottom figure, the effects of SSPS on the gelation process of 11S globulin is illustrated.

考 察

今回の結果より、SSPSは11Sグロブリンのゲル化を阻害することが明らかとなった。SSPSは11Sグロブリンの熱安定性を高めることによって、熱変性分子の生成を抑制する。ゲルのネットワーク構造の形成は、変性分子の会合によって起こることから、ゲル化の初期のステップが阻害されることになる。また、SDS-PAGE分析の結果から、11Sグロブリンのジスルフィド架橋を介した重合化も妨げられることが示された。その結果、電子顕微鏡観察の結果で示されたように、分子会合によるストランドの形成およびネットワーク構造の形成が抑制され、ゲル化点も遅延されることになる。このように、SSPSは総合的に11Sグロブリンのゲル化を阻害し、そのゲルの破断強度を低下させるにも関わらず、興味深いことに、動的粘弾性測定の結果では、逆にG'の最終値を上昇させていた。すなわち、SSPSを添加することにより、11Sグロブリンゲルは、小変形に対しての抵抗性が上昇する一方で、大変形に対しては壊れやすい性質のゲルに変化した。そのようなゲルの物性は、電子顕微鏡観察の結果で示されたような、繭状の会合体を特徴とする微細構造に基づいているものと思われる。

最後に、SSPSの効果のメカニズムを模式図によって示す (Fig. 5)。SSPS無添加の場合 (上図) には、

11Sグロブリンは加熱変性すると規則正しく重合してストランドを形成する。今回の場合には、高イオン強度下で実験は行われているので、11Sグロブリン表面の負電荷は抑制され、分子の会合は主として、疎水性相互作用とジスルフィド結合によって生じていると思われる。加熱が続けられると、ストランドが寄り集まってネットワークが形成され固いゲルが完成する。

一方、SSPSを添加すると (下図)、SSPSはpH7.6では負電荷を持つので⁷⁾、同じ負電荷を持つ11Sグロブリンとは強く相互作用しないと予想される。この場合、SSPSは11Sグロブリンを押し固めて凝集させ、規則的なストランド形成を阻害し、ランダムな会合を促進する。その結果、11Sグロブリンの巨大会合体の部分とSSPSのマトリックスの部分とが相分離を起こし、柔らかいゾルやゲルの形成につながると考えられる。このような相分離ゲルは、同電荷の高分子を混合した際には、しばしば見受けられる現象である⁸⁾。

本研究では、高イオン強度下での実験結果のみについて報告した。私達は、低イオン強度下での研究も開始しており、その場合には、11Sグロブリンのゲル化はSSPS添加によって促進されること、またゲルの破断強度も上昇することが確かめられている (未発表データ)。この結果は、SSPSを働かせる条件を様々に変化させることにより、大豆たん白質ゲルの物性を多様に改善できる可能性を示している。今後、様々な溶液条件での検討を進めてゆきたい。

要 約

11Sグロブリンの高イオン強度下でのゲル化挙動に与える水溶性大豆多糖類 (SSPS) の添加効果を検討した。SSPSの添加濃度の上昇に伴い、11Sグロブリンゲルの破断強度は低下した。DSC測定の結果、11Sの熱安定性はSSPS添加により上昇することが示された。11Sグロブリンの加熱による重合体の形成をSDS-PAGEにより解析したところ、SSPSの添加により重合体形成が抑制されていた。さらに、動的粘弾性測定の結果、11Sグロブリンのゲル化はSSPS添加によって遅延されることが示された。走査型電子顕微鏡観察の結果、11Sグロブリンゲル中のネットワーク構造が、SSPSによって破壊されていることが示された。これらの結果は、11Sグロブリンの加熱ゲル化がSSPSによって阻害されることを示している。一方で、動的粘弾性測定において、ゲル化後の貯蔵弾性率は、SSPS添加により上昇すること、また、電子顕微鏡観察により、SSPSを含むゲル中には、新たな巨大会合体構造が出現することが確認された。この結果は、SSPSが11Sグロブリンのゲル構造と物性を修飾し、新たなタイプのゲルを創出していることを示唆している。

文 献

- 1) Friedman M and Beandon DL (2001): Nutritional and health benefits of soy proteins. *J Agric Food Chem*, **49**, 1069-1086.
- 2) Utsumi S, Matsumura Y and Mori T (1997): Structure-function relationships of soy proteins. in: *Food Proteins and Their Applications*. Damodaran S and Paraf A, eds., Marcel Dekker, pp. 257-291.
- 3) 西成勝好, 位田毅彦, 余川丈夫 (1999): テクスチャーモディファイヤーと食感. 新食感事典. 西成勝好, 中沢文子, 勝田啓子, 戸田 準編集, サイエンスフォーラム, 東京, pp. 295-307.
- 4) Oakenfull D, Miyoshi E, Nishinari K and Scott A (1999): Rheological and thermal properties of milk gels formed with k-carrageenan. I. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, **13**, 525-533.
- 5) 松村康生, 李 俊 (2006): 大豆たん白質の分散安定性に及ぼす酸性多糖類の影響. 大豆たん白質研究, **9**, 53-57.
- 6) Nagano T, Hirotsuka H, Mori H, Kohyama K and Nishinari K (1992): Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. *J Agric Food Chem*, **40**, 941-944
- 7) Maeda H (2000): Soluble soybean polysaccharides. In: *Handbook of Hydrocolloids*. Philipps GO and Williams PA, eds., CRC Press, pp. 309-320.
- 8) Sylvie L T and Beaulieu M (2001): Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **15**, 583-591.