

分離ダイズタンパク質の物性変化と消化酵素作用に及ぼす
エクストルージョン加熱の効果

森 恵・地阪 光生・横田 一成・滝波 弘一
永井 光男・津田 文朗

Effects of Extrusion Heating on Physicochemical Property and
Enzymatic Digestibility of Soybean Protein Isolate

Megumu MORI, Mituo JISAKA, Kazushige YOKOTA, Koichi TAKINAMI,
Mituo NAGAI and Humiaki TSUDA

Abstract Extrusion heating was applied to SPI in order to investigate the interrelationship between the physicochemical properties and the enzymatic digestibility of SPI containing 70% water. Extrudates were prepared at the dough temperature of 60, 89, 126, 139, 154°C corresponding to the die temperature of 80, 100, 125, 148, and 160°C respectively. Conventionally heated samples were prepared by heating at 100°C for 2hr. Melting point of SPI was measured by using a laboratory-scale twin-screw extruder (Laboruder TEX-L Japan Steel Works, Ltd.). The measured melting point was about 135°C. Properties of extrudates were investigated by protein determination, SDS-PAGE, amino acid analysis and enzymatic hydrolysis. Over melting point, the solubility of extrudates increased and the digestibility was extremely enhanced. From the result of SDS-PAGE of water soluble fraction, major bands of all water soluble fraction were acid subunit of glycinin and Gly m Bd 34 K. In amino acid analysis, the amount of hydrophobic amino acids gradually increased, with rising die temperature.

Key words: Soy-protein; extrusion-heating; trypsin-digestion.

緒 言

分離ダイズタンパク質は、ダイズタンパク質中の約80%をしめる主要貯蔵タンパク質であり、12個のサブユニットから構成されたグリシニン及び3量体である β -コングリシニンから構成されている。この他に少量成分として生理活性を有するリポキシゲナーゼ、 β -アミラーゼ、トリプシンインヒビターなどが含まれている。主要貯蔵タンパク質は、球状構造を有するグロブリンであり、酸性(pH4.5)で沈殿する性質を有することから、酸性沈殿タンパク質(APP)とも呼ばれる。このような性質を利用し、グリシニン及び β -コングリシニンを精製する方法が、Thanh *et al.*¹⁾により報告された。また、ダイ

ズタンパク質は、メチオニンを除く必須アミノ酸に富み食品素材としての利用価値が高いため、古くから食糧として、また加工食品の原料として頻度高く用いられてきている。

食品素材としてのダイズタンパク質の有効利用を高める為に、近年注目を浴びているのが、エクストルージョン加熱である。食物素材タンパク質の組織化に使用されているエクストルーダは、加熱、加圧、混合、剪断などの複数の作用を同時に組み合わせて行うことに優れ、大型機器では、200°Cを越える加熱さえも可能とする。ダイズタンパク質をエクストルージョン加熱し、物理化学的特性としての示差熱分析、水分保持量、溶解温度などを求めた報告が最近出版されたが²⁾食品利用のための基礎研究として、タンパク質の微細構造及び生化学的特性についての研究はこれからの課題である。

永井光男・津田文朗：日本製鋼所

ダイズタンパク質は、他のタンパク質に比較して、nativeな状態では、タンパク質の分子鎖がかなりコンパクトに折り畳まれた球状構造を有している。従来から行われてきた普通の加熱では、疎水領域での疎水結合（凝集）を生じ、内部に存在するプロテアーゼ作用部位は、タンパク質の凝集により、酵素作用を受けにくい構造になっていると考えられる。このような消化性低下を改善するため、エクストルージョン加熱によりタンパク質分子を溶融させ、新たな分子状態を創生して酵素作用を高めることが期待される。

本研究では、エクストルーダを用い、水分添加70%でダイ温度80~160°Cの加熱を行いサンプルを調製した。このサンプルについて、水溶解性及びSDS溶解性を調らべることにより、非共有結合の依存性を解明し、また、可溶化した画分に関して、SDS-PAGEを行い、分子量の変化を測定した。また、*in vitro*での蛋白質分解酵素による消化性については、ペプシン及びトリプシンを作用させ、凝集したタンパク質の可溶化率を定量して比較検討した。

実験材料及び実験方法

1. 実験材料

旭油脂株式会社製分離ダイズタンパク質(SPI)を用いた。分離ダイズタンパク質(SPI)の調製方法を次に示す。ダイズを脱皮し、n-hexaneで脱脂後、水抽出を行った。この際、30ppmの亜硫酸ナトリウムを添加した。残渣除去後、塩酸にてpH4.5に調整後、酸性沈殿タンパク質を回収し、水酸化ナトリウムで中和後、スプレイドライし調製した。

2. 実験装置及びサンプル調製

エクストルーダは、日本製鋼所のLaboluderTEX-Lを使用した。エクストルージョン条件を次に示す。スクリュ外径、30mm; スクリュ長さ、300mm; スクリュ回転数、100rpm; feedrate, 350g/hr; water rate, 815g/hr; water addition, 70%で行った。エクストルーダの構造の概略をFig. 1. に示し、また、サンプル調製温度条件については、表1に示す。

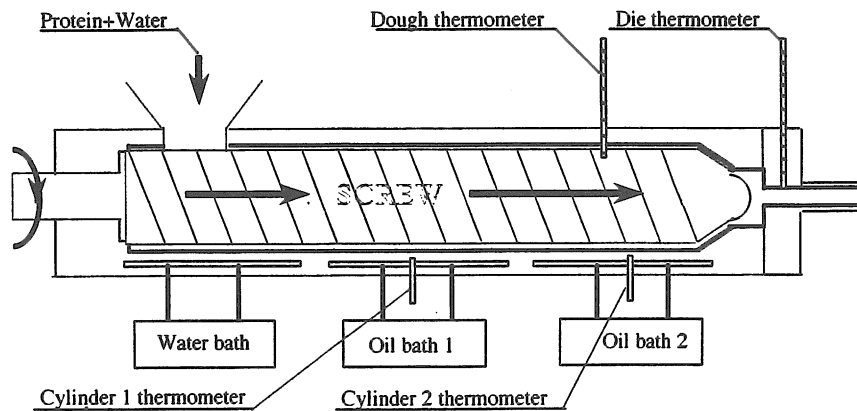


図1 エクストルーダの概略図

表1 エクストルージョンサンプル調製の温度条件

温 度 (°C)					
Oil bath 1	Oil bath 2	Cylinder 1	Cylinder 2	Dough	Die
79	81	62	68	69	80
120	85	85	87	89	100
131	175	102	133	126	125
169	210	108	154	139	148
190	232	119	165	154	160

エクストルーダにSPIをフィードし、少なくとも10分間は運転を続け、加熱押出が安定してから、サンプルを採取した。調製したサンプルは、凍結乾燥後、粉碎し-30°Cで保存した。また、エクストルージョン加熱サンプルとの比較のために単純加熱サンプルを次のように調製した。5gのSPIに11.6mlの蒸留水を添加し、2hr、100°Cにて加熱後、破砕し凍結乾燥を行い-30°Cで保存した。

3. 溶融点の測定

油槽1及び2は、初め60°C及び70°Cに設定し、少なくとも10分間は、安定のために先の条件で運転した。安定後のエクストルーダのシリンダ1及び2は54°C及び61°Cを示した。油槽2を温度制御することにより、シリンダ2の温度を163°Cまで約3°C/minで上昇させ、その際のドウ温度及びトルク値を測定した。

4. 水溶解性の検討

タンパク質サンプル35mgに10mlの蒸留水を添加し、37°C 1hrインキュベート後、12,000rpm、20°Cで20min遠心後、上清を回収した。上清をLowry法⁶⁾によりタンパク質定量を行った。また、インキュベート前後にpHを測定した。

5. 非共有結合依存性の測定

サンプル5mgに1mlの蒸留水を添加し、37°C、1hrインキュベート後、12,000rpm、20°Cで20min遠心後、上清を回収しタンパク質定量を行った。沈殿物は、凍結乾燥後、1mlの蒸留水を添加し、上記と同様の条件でインキュベート、遠心後、タンパク質定量を行った。さらに沈殿物を凍結乾燥を行い、1mlの蒸留水を添加し、同様の条件でインキュベート、遠心後、タンパク質定量を行った。

このようにして水可溶性タンパク質成分を除去した残渣を凍結乾燥し、得られた沈殿物に1mlの10%SDSを添加し、37°C、1hrインキュベート後、12,000rpm、20°Cで20min遠心後、0.8mlの上清を回収しタンパク質定量を行った。沈殿物を凍結乾燥し、得られた沈殿物に0.2mlの蒸留水及び0.8mlの10%SDSを添加後、上記の条件でインキュベート、遠心しタンパク質定量を行った。この過程をさらに2回行い、タンパク質の結合依存性の割合を検討した。⁷⁾ また、これらの水可溶性画分及びSDS可溶性画分はLaemmli *et al.*⁸⁾による方法に従い、SDS-PAGEを行い、分子量測定を行った。

6. 水可溶性画分のアミノ酸組成の分析

PICO-TAGワークステーションを用い、タンパク質10µg相当を窒素ガス存在下で気相塩酸加水分解した。減圧乾固後、中和化試薬(EtOH/H₂O/トリエチルアミン、2:2:1, v/v)を添加し、(再び減圧乾固した。誘導化試薬(EtOH/H₂O/トリエチルアミン/フェニルイソチオシアネート、7:1:1:1)を添加し、生成したフェニルチオカルバモイルアミノ酸(PITC-amino acid: タンパク質量0.5µg相当)を逆相カラムHPLCで分析した。

7. 酵素反応

サンプル100mgに10mlの0.05% trypsin solution in 0.05 M phosphate buffer (pH8.0)、もしくは0.05M phosphate buffer (pH8.0)を添加(meal/enzyme, 20:1)し、37°C 1hrインキュベート後、熱湯に5min間浸け、反応停止した。12,000rpm、20°Cで20minで遠心し、上清のタンパク質量を定量した。また、遠心後、残渣を10mlの蒸留水で洗浄しながら濾過し、あらかじめ恒量を秤量した坩堝に移し、3hr、105°Cで乾燥後、1hrデシケーター中で放置し乾燥残渣量を測定した。^{8),9)} ペプシンによる消化性の比較検討は、用いる緩衝液をHCl-KCl、pH2.0にし、基質酵素比率を200:1とした。

消化率の算出は、下の式で行った。

$$\text{消化率(\%)} = \frac{\text{酵素可溶性タンパク質量}}{\text{酵素無添加緩衝液中の不溶性タンパク質量}} \times 100$$

結果及び考察

エクストルージョン加熱中のドウ温度の変化を図2に示した。シリンダ2の温度を69°Cから154°Cへ直線的に温度上昇させエクストルージョン加熱を行ったところ、135°Cで吸熱反応が生じていることを見いだした。このときSPIは、半透明の溶融状態であることが可視シリンダより観察された。また、この際のモーターにかかる負荷を示すトルクの値は最小値を示し、非常に流動性が高いことを示していた。

次に、得られたエクストルージョン加熱サンプル(ドウ温度: 69~154°C)の水可溶性を調べた結果を図3に示した。エクストルージョン加熱温度の上昇に従って、溶解度は低下する傾向を示すが、吸熱温度(135°C)以上では、反対に溶解度は上昇する傾向に変化した。水可溶性画分をSDS-PAGEで分析した結果を図4に示す。この

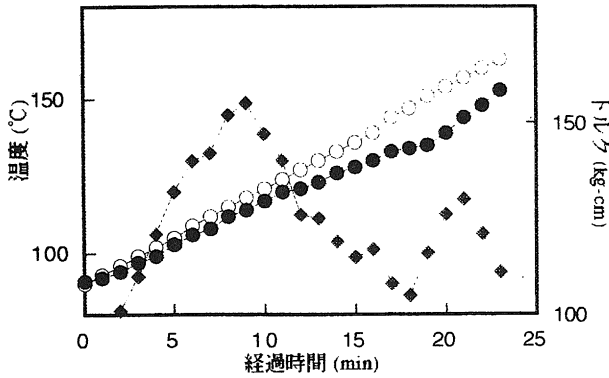


図2 エクストルージョン加熱の温度推移
 -○-:cylinder 2, -●-:dough,
 -■-:torque

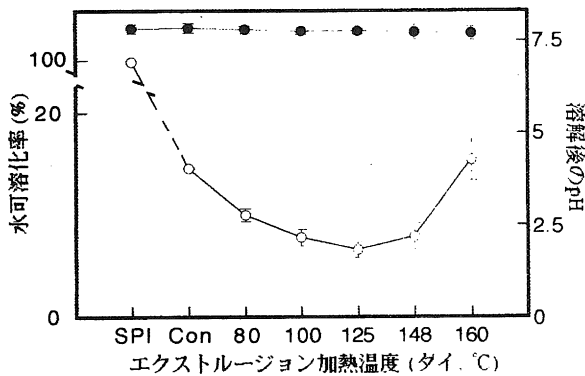


図3 エクストルージョン加熱による水可溶性の変化
 (○)は、未処理のSPIの溶解度を100%としたときの可溶性率を示し、(●)は、インキュベーション後のpHを示す。

結果では、主要なバンドはグリシニンの酸性サブユニット及びGly m Bd 34 Kであった。また、ダイ温度80°Cのサンプルに関しては、塩基性サブユニットが認められ、ダイ温度80~125°Cのサンプル及び単純加熱サンプルに関しては、主要タンパク質成分以外のタンパク質成分が認められた。さらに、特徴的なこととして、溶融点以上のダイ温度160°Cのサンプルに関しては、ブロードなバンドを示し、タンパク質の低分子化が認められた。一方、β-コングリシニンのα、α'及びβ-サブユニットのバンドは、ほとんどSDS-PAGEゲル上に認められなかった。この結果から、β-コングリシニンは、非常に凝集力が強いことが判明した。これは、Frederick A. *et al.*⁷⁾の結果と一致している。

最近、Gly m Bd 34 Kは、今日、社会的問題となっている主要アレルゲンタンパク質であることが、T. Ogawa *et al.*により報告された。¹¹⁻¹³⁾ 従って、この結果は、新しいアレルゲン低減化法の可能性を示唆するものである。

さらに、水可溶性画分のアミノ酸分析の結果を表2に示す。エクストルージョン過程の温度の上昇に従って、親水性アミノ酸の含有量が若干ではあるが、増加の傾向を示した。

つぎに、非共有性依存性を調べた結果を図5に示す。図5より明白なようにダイ温度125°C及び148°Cのサンプルでは、4回目のSDSによる抽出でさえ15%程度のタンパク質が抽出されている。このことから、非常に非共有結合依存性の高い凝集物であることが認められた。一方、溶融点以上のダイ温度160°Cでは、上記の2つのサンプルより非共有結合依存性が低下している。この結果より溶融点以上の温度では、タンパク質の構造変化が推測さ

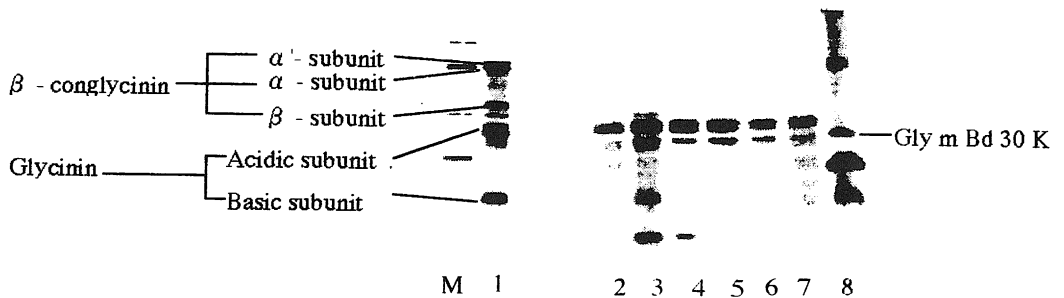


図4 水可溶性画分のSDS-PAGE
 アクリルアミドは、12.5%濃度で行った。Mはstandard marker (タンパク質量 5μg/lane)を示し、上から97.4, 68.0, 45.0, 29.0 kDaである。また、Lane 1~7は、分離ダイズタンパク質 (25 μg/lane)、単純加熱サンプル、エクストルージョンサンプルダイ温度 80, 100, 125, 148, 160°C (15μg/lane)である。Lane 8は、oil body protein (20μg/lane)である。

表2 タンパク質の水可溶性画分のアミノ酸組成

Amino acid	SPI	Con	80°C	100°C	125°C	148°C	160°C
Asx	11.5	12.7	11.3	14.6	12.5	14.1	11.3
Glx	19.1	26.7	23.0	21.3	24.2	24.4	25.5
Ser	6.9	6.5	6.8	6.5	6.7	5.8	6.3
Gly	7.5	8.4	8.0	7.4	8.2	6.9	7.6
His	2.2	2.7	2.9	2.4	2.9	2.7	2.7
Arg	6.1	6.8	6.5	4.9	6.4	5.9	6.7
Thr	4.2	3.8	3.9	3.3	3.7	7.6	3.5
Ala	5.5	4.5	4.6	6.2	4.4	5.6	5.0
Pro	6.1	6.8	6.3	6.2	6.4	7.6	6.7
Tyr	2.7	1.8	1.9	0.2	1.8	1.1	1.8
Val	4.8	3.7	3.6	3.6	3.4	3.6	3.7
Met	0.9	1.1	1.6	2.6	1.2	1.3	0.9
Cys	0.1	-	0.3	1.3	0.4	-	-
Ile	4.9	3.7	4.0	4.1	3.4	2.9	3.5
Leu	7.5	5.3	5.4	6.0	4.9	3.0	5.0
Phe	4.0	3.0	2.2	1.5	2.1	1.2	2.8
Lys	6.0	2.6	7.8	7.8	7.2	6.3	7.1
Hydrophilic	44.9	51.5	51.5	51.0	53.2	53.4	53.3

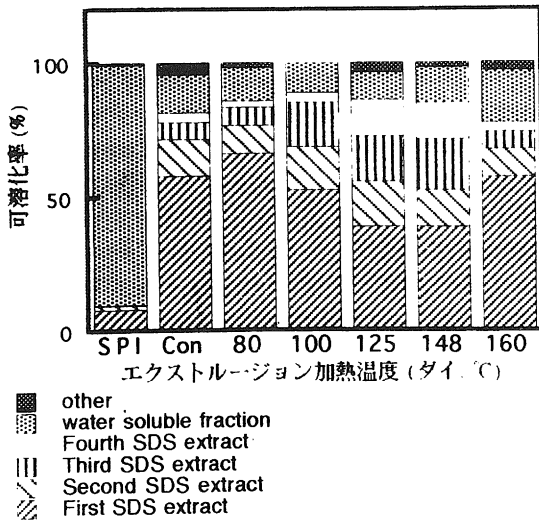


図5 タンパク質の非共有結合に及ぼすエクストルージョン加熱の影響

れる。また、図6にSDSによる1回目の抽出画分のSDS-PAGEの結果を示した。この結果では、先の水可溶性画分には認められなかったβ-コングリシニンのバンドが主要なバンドを占めた。これは、先の結果を裏づけるものであり、さらには、上述したようにβ-コングリシニンの非共有結合依存性の高さを示すものである。また、水可溶性画分に認められたGly m Bd 34 KのバンドはSDS可溶性画分には認められなかった。

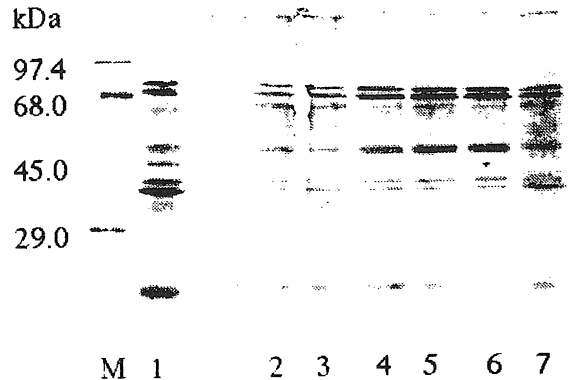


図6 SDS可溶性画分のSDS-PAGE

アクリルアミドは、12.5%濃度で行った。Mは、standard marker(タンパク質量 5μg/lane)を示す。また、Lane 1~7は、分離ダイズタンパク質(25 μg/lane)、単純加熱サンプル、エクストルージョンサンプルダイ温度 80, 100, 125, 148, 160°C(15μg/lane)である。

次に、プロテアーゼであるトリプシン及びペプシンによる消化性を検討した結果を図7及び図8に示す。この結果より明らかなように溶融点以上の温度においては、消化性は非常に高くなり、溶融点以上の温度においては、タンパク質の物性に大きな変化が生じたことを示している。

タンパク質の加熱による凝集は、Tombs *et al.*¹⁴⁾を初めとする多くの研究者によって指摘されているように一

般に球状タンパク質の場合、内部に折り畳まれている疎水領域が若干外部に露出し、疎水結合を形成し不溶化すると考えられてきた。しかしながら、本研究で我々が示した物性の変化つまり溶融点以上の温度では、水可溶性の上昇及び消化性の向上が認められたため、上に述べたように一部分の疎水性領域の凝集では説明できない。なぜならば、溶融点以上の疎水領域の外部への露出が溶融点以下の露出と同様の過程で生じていると仮定すれば、消化性の向上がこのよう(図7及び図8)に高くなることはあり得ない。つまり、タンパク質が溶融という非常に流動性の高い過程を経ることにより、内部に存在する疎水性領域が均等に分散し、プロテアーゼ作用部位を外部に露出することにより消化性は向上したと考えられる。また、溶融点以上における水可溶性の上昇は、上に挙げた理由のほかにペプチドの切断による低分子化も要因の1つであるかもしれない。

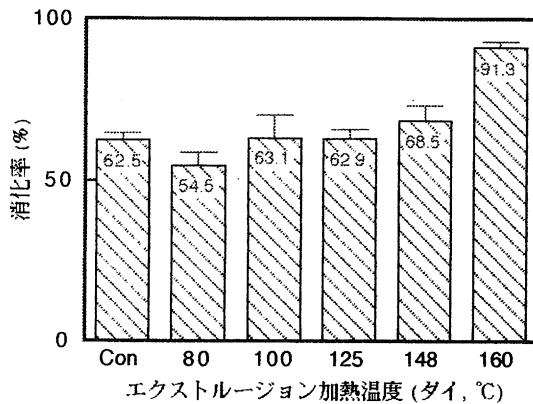


図7 トリプシンによるタンパク質の消化

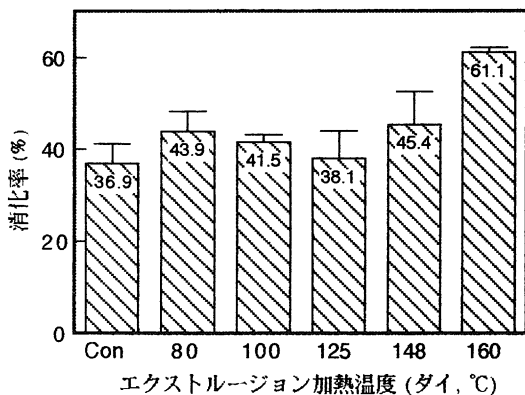


図8 ペプシンによるタンパク質の消化

引用文献

- 1) TAYLOR, S. L., Allergic and sensitivity reactions to food component. In HATHCOCK, J. N.(ed.), *A Series of Monographs, Nutrition: Basic and Applied Science*. Academic Press, San Diego, pp. 173-198, 1987.
- 2) EASTJAM, E. J., Soy protein allergy. In HAMBERGER, R. N.(ed.), *Food Intolerance Infancy: Allergology, Immunology and Gastroenterology, Carnation Nutrition Education Series*. The Carnation Co., Los Angeles/Raven Press, New York, Vol. 1, pp. 223-236, 1989.
- 3) BUSH, R. K. and S. L. TAYLOR, Soybean oil is not allergenic to soybean-sensitive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **76**: 242-245, 1985.
- 4) THANH, V. H. and K. SHIBASAKI, Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **24**: 1117-1121, 1976.
- 5) KITABATAKE, N. and E. DOI, Denaturation and texturization of food protein by extrusion cooking. KOKINI, J. L. et al. (eds.), *Food Extrusion Science and Technology*, Marcel Dekker, Inc., pp. 361-371, 1992.
- 6) LOWRY, O. H., N. J. ROWEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- 7) FREDERICK, A. N. and J. A. MAGE, *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 131-133, 1991.
- 8) LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
- 9) GUJSKA, S. F. and L. SAVOIE, *J. Food Science*, **51**: 1013-1016, 1986.
- 10) MERTZ, E. T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**: 1-2, 1984.
- 11) OGAWA, T., H. TSUJI and K. KITAMURA, Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**: 1030-1033, 1993.
- 12) TSUJI, H., T. OGAWA, N. BANDO, M. KIMOTO and K. SASAOKA, *J. Biol. Chem.*, **265**: 16064-16067, 1990.
- 13) OGAWA, T., N. BANDO and H. TSUJI, Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **37**: 555-565, 1991.