

大豆  $\beta$ -コングリシニン分子種の乳化特性についてEmulsifying Properties of Molecular Species of Soybean  $\beta$ -Conglycinin

星 祐二\* 引地涼子\* 菊地智子\* 工藤晶子\*  
 Yuji HOSHI Ryoko HIKICHI Tomoko KIKUCHI Akiko KUDO

$\beta$ -conglycinin is one of the major storage proteins of soybean and is a trimeric protein composed of three subunits,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ , and  $\beta$ . The  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunits contain extension regions in addition to the core regions common to all subunits. We prepared  $B_0$  ( $\beta 3$ ),  $B_1$  ( $\alpha'1\beta 2$ ),  $B_3$  ( $\alpha 1\alpha'1\beta 1$ ) and  $B_5$  ( $\alpha 2\alpha'1$ ) conglycinins from var. Miyagishirome, and estimated the emulsifying activity, adsorbed rate on oil-water interface, surface hydrophobicity and surface tension of  $\beta$ -conglycinin trimers in order to clarify the roles of each subunit in emulsification.  $B_3$  and  $B_5$  showed excellent emulsifying activities and absorption rates on oil-water interfaces, and surface hydrophobicities increased with the content of  $\alpha$ -type subunits ( $\alpha$  and  $\alpha'$ ). When  $\beta$ -conglycinin is digested with chymotrypsin, stable fragments with molecular weights of 50 and 47 kDa corresponding to the size of the core region, in addition to 61 kDa fragments, are generated in the degradation course<sup>1)</sup>. Emulsifying activity of digested  $\beta$ -conglycinin immediately began to fall within 5 min of degradation and continued to decline to 40% of that of undigested  $\beta$ -conglycinin after 60 min. This result seems to show the importance of the extension region in emulsification with  $\beta$ -conglycinin. The relative ratios of the subunits of  $\beta$ -conglycinin trimers ( $B_1$ ,  $B_3$ ,  $B_5$ ) adsorbed on the oil-water interface were observed to be constant both before and after emulsification from SDS-PAGE analysis, and it seemed that  $\beta$ -conglycinin was adsorbed on the oil-water interface, while maintaining the subunit structure of the original. On the other hand, when the cream layer that was recovered from an emulsion prepared with  $\beta$ -conglycinin solution by centrifugation was digested with chymotrypsin, the electrophoretic pattern of  $\beta$ -conglycinin was similar to that of undigested and adsorbed  $\beta$ -conglycinin; unlike the digestion in the solution state. It therefore appeared that  $\beta$ -conglycinin was adsorbed on oil-water interfaces in a multilayer state. There was no difference in surface tension among the  $\beta$ -conglycinin trimers.

## 1. 緒言

大豆タンパク質は優れた加工特性を有するため、種々の加工食品に加える素材として広く利用されてきたが、最近では、血清コレステロール低下能などの生理機能が注目され、その用途の拡大が期待される素材である<sup>2)</sup>。大豆タンパク質を畜肉加工品などの製造に利用する場合、大豆タンパク質の乳化特性は極めて重要な性質となる<sup>3)</sup>。

大豆タンパク質は、主としてグリシニンと $\beta$ -コングリシニンからなり、グリシニンは、酸性ポリペプチドと塩基性ポリペプチドがS-S結合で結合して形成されるサブユニットからなる六量体タンパク質で、グリシニンの構造と食品機能特性相関については、サブユニットおよび分子レベルでの解析もなされ、いくつかの関係が明らかにされている<sup>4-7)</sup>。

$\beta$ -コングリシニンは $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$ の3種のサブユニットを構成成分とした3量体構造をとる糖タンパク質であり<sup>8)</sup>、 $\beta$ サブユニットは、3種のサブユニット間で1次構造の相関性の高いコア領域(416残基)のみから構成されている。

一方、 $\alpha$ と $\alpha'$ サブユニットは、コア領域に加え、そのN末端側にそれぞれ125および141残基よりなる親水性の強いエクステンション領域が結合しており、 $\alpha$ と $\alpha'$ サブユニット間のコア領域では86.8%、 $\alpha$ と $\beta$ 間で75.5%、 $\alpha'$ と $\beta$ 間で71.4%の相関性があると報告されている<sup>9)</sup>。

$\beta$ -コングリシニンには、上記の3種のサブユニットの組み合わせから、10種の分子種が計算上は存在することになるが、これまで $B_0$ ~ $B_6$ までの7種の分子種が分離されている<sup>10,11)</sup>。著者はかつて、 $B_0$ 、 $B_1$ 、 $B_3$ 、 $B_6$ コングリシニンを分離し、各分子種の乳化特性について検討を行ったところ、 $\beta$ サブユニットのみからなる $B_0$ の乳化活性がもっとも低いのに対し、 $\alpha$ サブユニットのみからなる $B_6$ がもっとも高く、 $B_0$ の4.6倍という結果を得ている<sup>12)</sup>。しかしながら前報では、イオン交換クロマトグラフィーからの溶出液をそのまま試料として用いたことから、保存が困難なため1回の実験に供することのできる試料溶液の量が少なく、タンパク質濃度も0.2%と低いものであった<sup>12)</sup>。

$\alpha$ と $\alpha'$ サブユニットのエクステンション領域間の相関

\*宮城学院女子大学

性は57.3%であることから<sup>9)</sup>、今回これらを $\alpha$ 系サブユニットとして、 $\beta$ -コングリシニン分子種をグループ1 {B<sub>0</sub> ( $\beta$ 3)}, グループ2 {B<sub>1</sub> ( $\alpha$ '1 $\beta$ 2), B<sub>2</sub> ( $\alpha$ 1 $\beta$ 2)}, グループ3 {B<sub>3</sub> ( $\alpha$ 1 $\alpha$ '1 $\beta$ ), B<sub>4</sub> ( $\alpha$ 2 $\beta$ 1)}, グループ4 {B<sub>5</sub> ( $\alpha$ 2 $\alpha$ '1), B<sub>6</sub> ( $\alpha$ 3)} の4つに分類し、各グループの中から比較的大量に調製できるB<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>分子種を分離した。そして、各分子種を凍結乾燥し、各分子種が単量体として溶解できる条件下で<sup>11)</sup>、乳化活性、吸着率、表面疎水性、および表面張力の測定を行うことにより、 $\beta$ -コングリシニン構成サブユニットの乳化機能発現におよぼす役割について検討した。

## 2. 実験材料と方法

### 1) 脱脂大豆粉の調製

ミヤギシロメ種の大豆から、既報にしたがって脱脂大豆粉を調製した<sup>13)</sup>。

### 2) SDS電気泳動

SDS電気泳動は、Laemmliの方法にしたがって、8%のゲル濃度で行った<sup>14)</sup>。染色にはCoomassie Brilliant Blue G-250を用い、脱色は5%メタノール-7.5%酢酸溶液中で行った。

### 3) $\beta$ -コングリシニンの調製<sup>15)</sup>

脱脂大豆粉100gに0.01M 2-メルカプトエタノール(2-ME)含有0.03M トリス-塩酸緩衝液(pH8.1) 1Lを加え、1時間攪拌後、遠心分離(10,000 rpm, 15 min)を行った。上清のpHを6.0に調整し、1時間攪拌後、遠心分離(10,000 rpm, 15 min)を行い、グリシニン画分を除去した。グリシニン画分を除去した後、上清のpHを4.8に調整して1時間攪拌後、遠心分離(10,000 rpm, 15 min)を行って、粗 $\beta$ -コングリシニン画分を得た。この粗 $\beta$ -コ

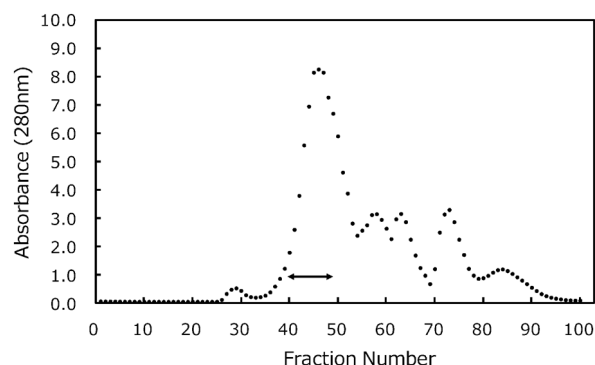


Fig. 1. Elution Pattern of  $\beta$ -Conglycinin on Sepharose CL-6B.

A column of Sepharose CL-6B (4 $\times$ 100 cm) was eluted with 35 mM phosphate buffer (2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 32.5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4M NaCl, pH7.6). Column effluents were collected in 15 mL fractions. Underlined fractions were recovered as a purified  $\beta$ -conglycinin.

ングリシニン画分を0.03M トリス-塩酸緩衝液に300 mLとなるように溶解し、pHを8.0に調整後、硫酸分画により(60%および90%硫酸飽和)部分精製 $\beta$ -コングリシニンを得た。これを0.01M 2-MEを含む35mMリン酸緩衝液(2.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 32.5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4M NaCl, pH7.6) 50 mLに溶解し、N-エチルマレイミド(NEM)を100 mg添加して遊離のSH基をブロック後、遠心分離(15,000 rpm, 15 min)を行った。NEMとの反応後、Sephacryl CL-6Bによるゲルろ過(カラムサイズ4.5 $\times$ 100 cm)にかけて、 $\beta$ -コングリシニンを精製した。溶出には2-MEを含まない上記35mMリン酸緩衝液を用い、1フラクションあたり15 mLずつ分取した。 $\beta$ -コングリシニンに相当する画分(フラクションナンバー40~51)を精製 $\beta$ -コングリシニンとして得た(Fig. 1)。

### 4) $\beta$ -コングリシニン分子種の調製<sup>15)</sup>

上述の精製 $\beta$ -コングリシニン溶液を19mMリン酸緩衝液(3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2M NaCl, pH7.8)に対して透析を行った。透析後、19mMリン酸緩衝液で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6Bのカラム(2 $\times$ 100 cm)にかけ、非吸着区分を溶出後、0.2M~0.35M食塩(各2L, 19mMリン酸緩衝液)によるグラジエント溶出を行った(1フラクション15 mL)後、Fig. 2の下線部を、それぞれB<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>コングリシニンとして回収し、純水に透析後、凍結乾燥を行った。各分子種のSDS電気泳動による泳動パターンをFig. 3に示した。

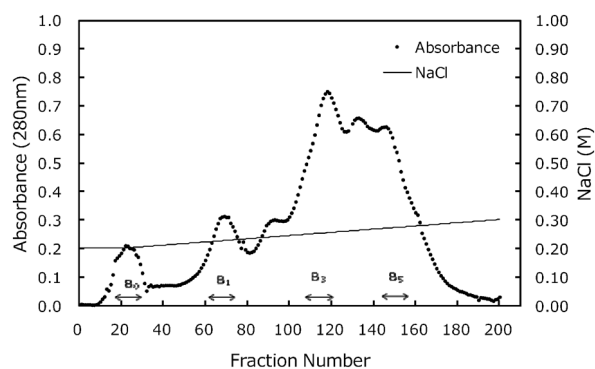


Fig. 2. Fractionation of  $\beta$ -Conglycinin on DEAE-Sepharose CL-6B.

The  $\beta$ -conglycinin fraction in Fig. 1 was concentrated and dialyzed against 19 mM phosphate buffer (3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 M NaCl, pH7.8). After dialysis, the  $\beta$ -conglycinin was adsorbed on a 1.5 $\times$ 60 cm column equilibrated with the same phosphate buffer as above. After application of the sample, elution was continued with a linear concentration gradient consisting of 2 L of the starting buffer in the mixing chamber and 2 L of the phosphate buffer made 0.35 M in NaCl (pH7.8) in the reservoir. Each fraction was 10 mL, and the underlined fractions were collected as B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>5</sub>, respectively.

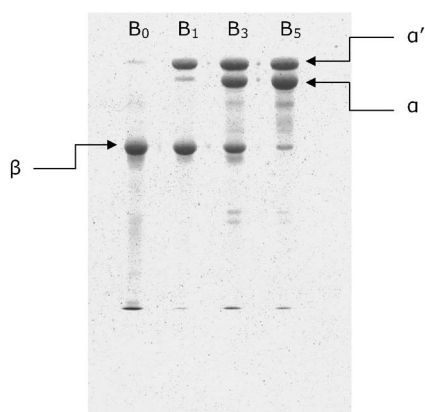


Fig. 3. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoretic Patterns of the B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>5</sub> in Fig. 2.

Electrophoresis was carried out according to Laemmli<sup>14)</sup> in 10% gels.

#### 5) タンパク質量

タンパク質の定量は、0.4%水酸化ナトリウム含む0.01 M トリス-塩酸緩衝液に溶解した  $\beta$ -コングリシニンを標準タンパク質として、Lowry 法により行った<sup>16)</sup>.

#### 6) 乳化活性の測定

各分子種を0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (0.5 M NaCl, pH8.0) に溶解し、遠心分離後 (15,000 rpm, 15 min), Lowry 法を用いて1%濃度に調整した。この各分子種溶液2.1 mLを内径16.5 mm, 長さ105 mmの試験管に移し、市販サラダ油 (日清オイリオ) 0.9 mLを加え、超音波発生装置 (TOMY, UD-201) を用いて20 Wで3分間、氷水中で乳化し、エマルジョンを調製した。得られたエマルジョン50  $\mu$ Lに0.5% SDSを含む0.01 M トリス-塩酸緩衝液3 mLを加えて攪拌後、さらにそこから50  $\mu$ Lを分取し、上記0.5% SDS溶液3 mLを加えて2次希釈を行った。この2次希釈エマルジョンの500 nmにおける見かけの吸光度を光路長1 cmのガラスセルを用いて測定し (HITACHI UV-VIS), Cameronらの方法にしたがって、エマルジョン1 mL中に形成される油滴界面積を次式により求め<sup>17)</sup>, 乳化活性の指標とした。

$$\text{乳化活性 (m}^2\text{/mL)} = 2 \times \frac{2.303 \times Abs \times D}{0.01} \times 10^6$$

ここで、*Abs* は見かけの吸光度、*D* は希釈倍数で今回は3721となる。

#### 7) 吸着率の測定

乳化活性測定用に調製したエマルジョンから2 mLを分取し、遠心分離 (15,000 rpm, 15min) を行って、クリーム層と水層とに分けた。水層をシリンジで10 mL容積のメスフラスコに移し、0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (0.5 M NaCl) で定容とした。水層に含まれるタンパク質量をLowry法により求め、乳化前後のタンパク質量の差から、油滴界面への吸着率を次式により求めた。

$$\text{吸着率 (\%)} = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100$$

ここで、 $P_0$  はエマルジョン2 mL中に含まれるタンパク質量 (mg),  $P_1$  は遠心分離後に水層に含まれるタンパク質量である。

#### 8) キモトリプシンによる $\beta$ -コングリシニンの分解<sup>1)</sup>

$\beta$ -コングリシニンを1%濃度となるように0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (0.5 M NaCl, pH8, 0) に溶解し、重量比で1/250となるようにTLCK処理キモトリプシンを加えた (37°C)。所定の時間ごとに反応液の一部を取り出し、SDS電気泳動用の試料処理液と混合し、90°C, 10分間加熱を行って反応を停止させてからSDS電気泳動による分析を行った。

#### 9) キモトリプシン分解 $\beta$ -コングリシニン溶液の乳化活性

1%濃度に調整した  $\beta$ -コングリシニン溶液 (0.01 M トリス-塩酸緩衝液, pH8.0) に重量比で1/250量となるようにTLCK処理キモトリプシンを加え (37°C), 所定の反応時間ごとに一定量を取りだし、キモトリプシンに対して2倍量のキモスタチンを加えて反応を止めた<sup>1)</sup>。キモトリプシン分解  $\beta$ -コングリシニン溶液の乳化活性は、上記「6) 乳化活性の測定」にしたがって評価した。

#### 10) 表面疎水性の測定

所定の濃度に調製した各分子種溶液 (0~0.5 mg/mL) に  $1.25 \times 10^{-4}$  M となるように8-アニリノ-1-ナフタリンスルホン酸アンモニウム (ANS) を加え、2時間放置後、励起波長395 nm, 蛍光波長475 nmでANS由来の蛍光強度を測定した (HITACHI 650-10型蛍光光度計)。タンパク質濃度に対して蛍光強度をプロットし、得られた直線の傾きから相対的な表面疎水性を求めた<sup>18)</sup>。

#### 11) 吸着サブユニット成分の検討

1%濃度に調整した、 $B_0$ を除く各分子種溶液から、「6) 乳化活性の測定」と同様にしてエマルジョンを調製し、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min) を行い、クリーム層と水層とに分けた。クリーム層に1% SDS溶液 (0.01 M トリス-塩酸緩衝液, pH8.0) 2 mLを加え、30分間攪拌した後、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min) を行って水層を回収した。回収した画分についてSDS電気泳動を行い、デンストメトリーによりサブユニットの存在比率を求めた<sup>19)</sup>。

#### 12) 油滴界面に吸着した $\beta$ -コングリシニンのキモトリプシンによる分解

1%濃度に調整した  $\beta$ -コングリシニン溶液を「6) 乳化活性の測定」と同様にして乳化後、エマルジョン2 mLを遠心管に移し、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min) を行って水層とクリーム層に分けた。回収したクリーム層に0.01 M トリス-塩酸緩衝液3 mLを加えて攪拌後、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min) を行ってクリーム層を洗浄した。遠心後、再度クリーム層を回収し、0.01 M トリス-塩酸緩衝液3 mLを加えて均一に懸濁した。乳化後にクリーム層を回収する操作を4回行い、回収したクリーム層懸濁液

を一つにまとめた。回収クリーム層懸濁液に、吸着率のデータから推定されるβ-コングリシニン量に対して1/125量となるようにTLCK処理キモトリプシンを加え、37°C、2時間振盪槽中で分解を行った。2時間後、キモトリプシンに対して2倍量のキモスタチンを加えて、30分間放置した。30分後、遠心分離(15,000 rpm, 15 min)を行って水層とクリーム層に別けた。分離したクリーム層に、2% SDS, 1% 2-ME, 20%ショ糖を含む0.05 M トリス-塩酸緩衝液を加えて30分間攪拌した後、遠心分離(15,000 rpm, 15 min)を行い、得られた水層を回収し、SDS電気泳動による分析を行った。

13) 表面張力の測定

β-コングリシニン各分子種溶液の表面張力は、ウィルヘルミープレート型表面張力計(協和界面科学 ESB-VH)を用いて測定した。β-コングリシニン各分子種を0.01M トリス-塩酸緩衝液(0.5 M NaCl, pH8.0)に0.05%濃度となるよう溶解し、そのうち7 mLを内径40 mm, 深さ10 mmのシャーレに移し、5分間放置後、表面張力の測定を開始した。60分後の表面張力値を各分子種の「平衡表面張力」とした。

また、0.01 M トリス-塩酸緩衝液に少量のタンパク質溶液を静かに注入し、注入後の表面張力の経時変化も測定した。内径35 mm, 深さ10 mmのシャーレに5 mLの0.01 M トリス-塩酸緩衝液(0.5 M NaCl, pH8.0)を入れ、表面張力の測定を開始し、5分後にマイクロピペットを用いて、1% β-コングリシニン各分子種溶液20 μLを静かに表面直下に注入した。注入後、表面張力の経時変化を15分間記録し、これを「非平衡表面張力」とした。

3. 結果

1) 乳化特性

「6) 乳化活性の測定」に記したようにしてエマルジョンを調製したところ、B<sub>0</sub>からはサラサラとした流動性のあるエマルジョンが、B<sub>5</sub>からは粘性のあるエマルジョンが得られた。

乳化活性と吸着率の結果をTable 1に示した。乳化活性はB<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>がそれぞれ0.318, 0.309という値を示し、α系サブユニットの多いB<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>はB<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>の2倍以上の値を示した。

吸着率は、βサブユニットのみからなるB<sub>0</sub>がもっとも低く、ついでB<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>とα系サブユニットの多い分子種ほど吸着率も高くなる傾向が認められ、α系サブユニットのみからなるB<sub>5</sub>は52.8%ともっとも高い値を示した。また、B<sub>3</sub>とB<sub>5</sub>を比較すると、B<sub>5</sub>の吸着率が15.7%高いにもかかわらず、乳化活性にはそれほどの差は認められなかった。

今回、乳化安定性の測定は行わなかったが、吸着率を測定する過程でエマルジョンを遠心分離したところ、B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>はクリーム層の上部に油の存在が認められ、これは遠心分離中に油滴が合一したものと考えられた。また、乳化に超

Table 1. Emulsifying Properties of Each β-Conglycinin Trimer

	Emulsifying Activity (m <sup>2</sup> /mL)	Adsorption Rate (%)
B <sub>0</sub> (β3)	0.318	14.0
B <sub>1</sub> (α'β2)	0.309	17.7
B <sub>3</sub> (α'αβ)	0.683	37.1
B <sub>5</sub> (α'α2)	0.706	52.8

Each β-conglycinin trimer was dissolved in 0.01 M Tris-HCl buffer (0.5 M NaCl, pH 8.0) at concentration of 1%. To prepare emulsions, 0.9 mL of a salad oil and 2.1 mL of the protein solutions were homogenized for 3 min in ice bath at a power of 20 W using an ultrasonic homogenizer (TOMY, UD-201). The emulsions prepared above were diluted 3721 times with 0.01 M Tris-HCl buffer containing 0.5% SDS. The apparent absorbance of the diluted emulsion was measured at 500 nm and the emulsifying activity index was calculated according to Cameron<sup>17)</sup>.

An emulsion was centrifuged at 15,000 rpm for 15 min and separated into an aqueous layer and a cream layer. Amount of protein in the aqueous layer was determined according to Lowry method<sup>16)</sup> and an adsorption rate was calculated from the amounts of proteins in aqueous layers before and after emulsification.

音波発生装置を用いた場合、乳化活性と乳化安定性にはパラレルな関係のあることが報告されており<sup>20)</sup>、B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>はB<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>に比較して乳化安定性も低いと推察される。

上述のように、α系サブユニットの多い分子種ほど乳化活性が高い傾向が認められ、β-コングリシニンが乳化機能を発現するにはα系サブユニットが重要な役割を果たしているものと考えられた。緒言でも述べたように、α系サブユニットの一次構造の特徴は、N末端から125番残基(α)および141番残基(α')までに非常に親水性の高い領域が存在していることであり、α, α'サブユニットは、βサブユニットとアミノ酸配列の相同性が高いコア領域のN末端側に、この親水性の強いエクステンション領域が結合したものであると考えられている<sup>9)</sup>。Fig. 4にα'サブユニットとβサブユニットのハイドロパシー図を、文献1)から再掲したが、α'サブユニットの141番残基以降のコア領域の親水性-疎水性パターンとβサブユニットのそれとが非常によく類似していることがわかる。

Fig. 5に、キモトリプシンによるβ-コングリシニンサブユニットの分解過程を経時的に記録した結果を、文献1)から再掲した。未分解のβ-コングリシニンには、分子量83 Kダルトン付近にα'サブユニット、73 K付近にαサブユニット、50 K付近にβサブユニットのバンドが認められたが、反応時間とともにα'サブユニットとαサブユニットのバンドが薄くなっており、120分以降ほぼ消失していた。一方、分解10分後から分子量61 K付近に新たなフラグメント(CT-1)が認められるようになるとともに、βサブユニットの下に約47 Kの分子量を有するフラグメント(CT-3)も生じていた。B<sub>0</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>個別の分解パターンとの比較から、CT-1はα'サブユニットが分解を受けて生じたもの、50 Kダルトン付近のCT-2はα'サブユ

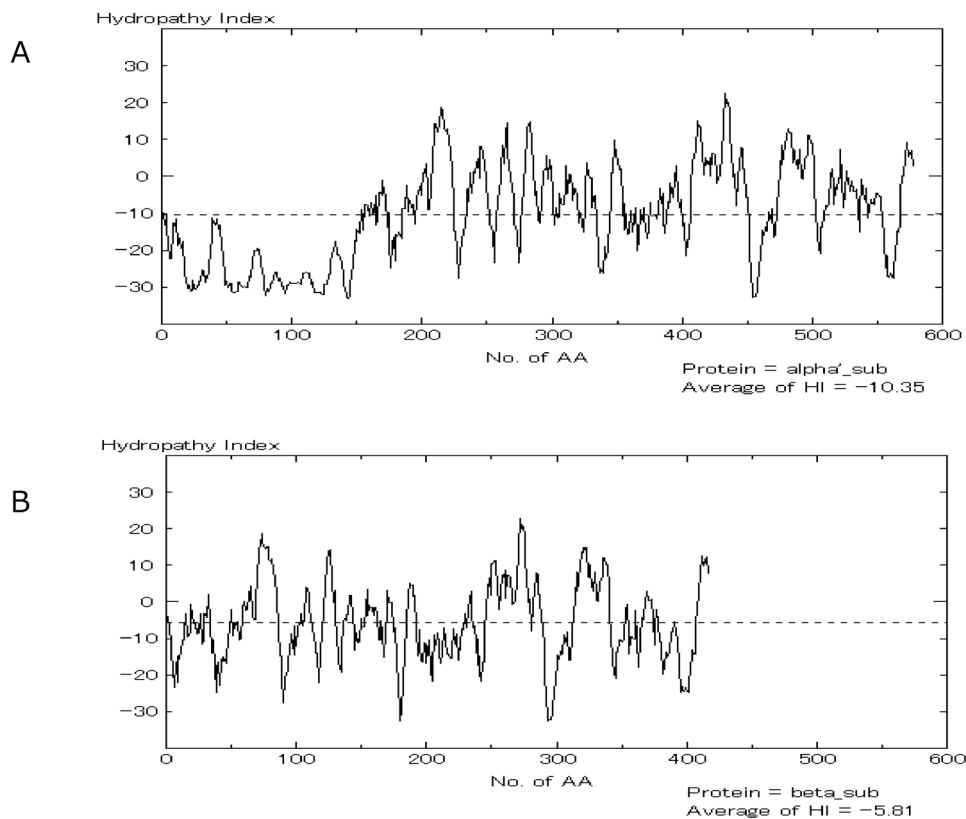


Fig. 4. Hydropathy Index Patterns of the  $\alpha'$  and  $\beta$  Subunit of  $\beta$ -Conglycinin.

The patterns are quotations from the reference 1).

A:  $\alpha'$  subunit, B:  $\beta$  subunit

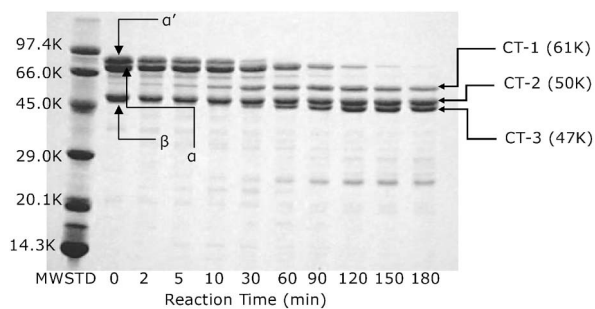


Fig. 5. Time course of Digestion of  $\beta$ -Conglycinin with Chymotrypsin.

$\beta$ -conglycinin (1%) was digested in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH8.0) at 37°C with a 250 : 1 protein to TLCK treated chymotrypsin ratio. Aliquots were subjected to electrophoresis.

The electrophoretic pattern is quotation from the reference 1).

“MWSTD” is molecular weight markers; phosphorylase b (97.4 k), bovine serum albumin (66.0 k), ovalbumin (45.0 k), carbonic anhydrase (29.0 k), trypsin inhibitor (20.1 k), lysozyme (14.3 k).

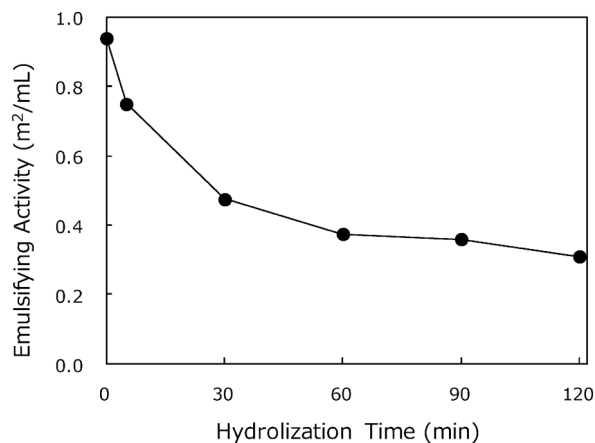


Fig. 6. Effect of Degradation of  $\beta$ -Conglycinin with Chymotrypsin on Emulsifying Activity.

$\beta$ -conglycinin (1%) was digested in 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 37°C with a 250 : 1 protein to TLCK treated chymotrypsin ratio. Double the amount of chymostatin to chymotrypsin was added to an aliquot at every predetermined time to stop the digestion. Emulsifying activity index was estimated according to Cammeron<sup>17)</sup>.

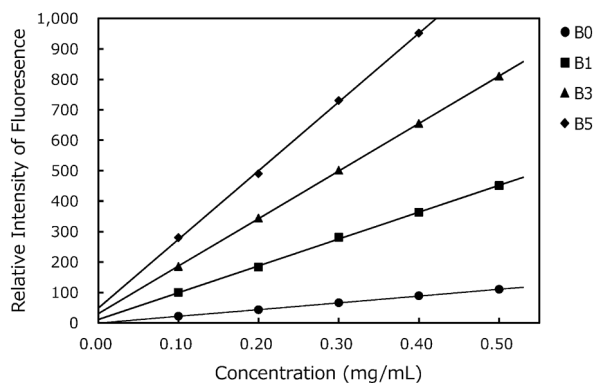


Fig. 7. Changes in Fluorescence Intensities with Concentrations of  $\beta$ -Conglycinin Trimers Reacted with ANS.

Ammonium 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS) was added at concentration of  $1.25 \times 10^{-4}$  M to  $\beta$ -conglycinin trimers' solutions of predetermined concentrations and the mixtures were stood at room temperature for 2 hours. Fluorescence intensities of the mixtures were measured at excitation wavelength of 395 nm and emission wavelength of 475 nm.

Table 2. Surface Hydrophobicity of Each  $\beta$ -Conglycinin Trimer

	Surface Hydrophobicity	
B <sub>0</sub>	22	(10)
B <sub>1</sub>	87	(40)
B <sub>3</sub>	155	(71)
B <sub>5</sub>	217	(100)

The inclination of the straight line in Fig. 7 was defined as intensity of surface hydrophobicity. The numerical values in parentheses are relative hydrophobicities to that of B<sub>5</sub>-conglycinin.

ニットが限定酵素分解を受けたものと未分解の  $\beta$  サブユニット, CT-3 は  $\alpha'$  および  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットが分解を受けて生じたもので,  $\beta$ -コングリシニンをキモトリプシンで分解すると,  $\alpha'$ ,  $\alpha$  サブユニットのコア領域とほぼ未分解に近い状態の  $\beta$  サブユニットとして存在する可能性が高い<sup>1)</sup>.

つぎに  $\beta$ -コングリシニンの乳化活性におよぼすキモトリプシン分解の影響を検討したところ, 分解後5分で乳化活性が低下し始め, 60分分解では未分解時の40%まで低下した (Fig. 6).

2) 表面疎水性

吸着率と各分子種の表面疎水性との関係を検討するために, ANS を用いて分子表面の疎水度を測定し, その結果を Fig. 7 に示した. 直線の傾きが表面疎水度を表しており, Table 2 に各分子種の表面疎水度を示した. 括弧内の数値は B<sub>5</sub> の表面疎水度を100とした場合の各分子種の相

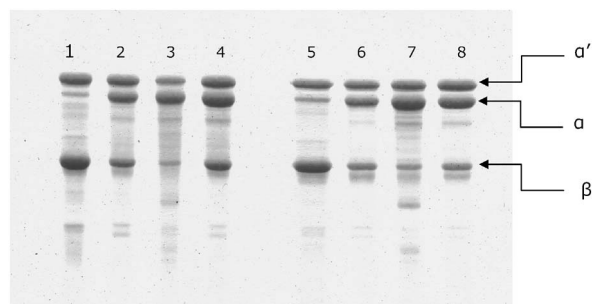


Fig. 8. Electrophoretic Patterns of  $\beta$ -Conglycinin Trimers Adsorbed on Oil-Water Interface.

Lanes 1 to 4 are SDS polyacrylamide gel electrophoretic patterns of  $\beta$ -conglycinin trimers before emulsification and lanes 5 to 8 are patterns of  $\beta$ -conglycinin trimers adsorbed on oil-water interface after emulsification. Electrophoresis was carried out according to Laemmli<sup>14)</sup> in 10% gels. lanes 1 and 5, B<sub>1</sub>; lanes 2 and 6, B<sub>3</sub>; lanes 3 and 7, B<sub>5</sub>; lanes 4 and 8,  $\beta$ -conglycinin

Table 3. Relative Amounts of Subunits of Each  $\beta$ -Conglycinin Trimer Adsorbed on Oil-Water Interface.

	Subunit	Before Emulsification (%)	After Emulsification (%)
B <sub>1</sub>	$\alpha'$	32.3	32.2
	$\beta$	67.7	67.8
B <sub>3</sub>	$\alpha, \alpha'$	66.3	71.2
	$\beta$	33.7	28.8
B <sub>5</sub>	$\alpha'$	33.5	35.3
	$\alpha$	66.5	64.7
$\beta$ -conglycinin	$\alpha, \alpha'$	67.5	76.5
	$\beta$	32.5	23.5

対的な値である.  $\beta$  サブユニットは疎水性アミノ酸を多く含むが<sup>22)</sup>,  $\beta$  サブユニットのみからなる B<sub>0</sub> の表面疎水度が低いことは, 興味深い結果であった. 一方, 親水性アミノ酸の多い  $\alpha$  系サブユニットのみからなる B<sub>5</sub> は, B<sub>0</sub> に比較して約11倍高い値を示し, 親水性アミノ酸を多く含むにもかかわらず, 疎水性が高いという結果が得られた. このように,  $\alpha$  系サブユニットの多い分子種ほど表面疎水性が高くなる傾向が認められ, 吸着率の結果を反映していた.

3) 油滴界面吸着サブユニット成分

油滴界面に吸着したサブユニット成分の SDS 電気泳動パターンを Fig. 8 に, 乳化前後の各サブユニット量の相対的变化を Table 3 に示した. B<sub>3</sub> については若干  $\alpha$  サブユニットが増加し,  $\beta$  サブユニットが減少してはいたが, B<sub>1</sub>, B<sub>5</sub> は乳化前後でサブユニット組成にほとんど変化がみられなかった.  $\alpha$  系サブユニットを多く含むものほど吸着

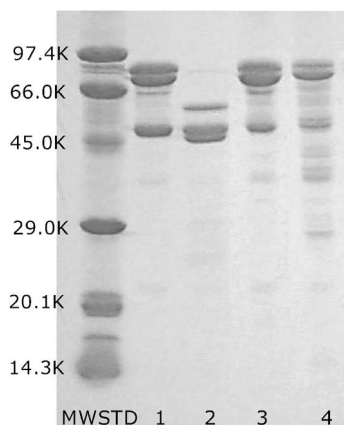


Fig. 9. Electrophoretic Patterns of  $\beta$ -Conglycinin Digested with Chymotrypsin after Emulsification.

“MWSTD” is the same molecular weight markers as in Fig. 3.

Lane 1 is the pattern of undigested and unemulsified  $\beta$ -conglycinin.

Lane 2 is the pattern of  $\beta$ -conglycinin digested in Tris-HCl buffer and unemulsified.

Lane 3 is the pattern of  $\beta$ -conglycinin undigested and adsorbed on oil-water interface.

Lane 4 is the pattern of  $\beta$ -conglycinin after digestion with chymotrypsin in the cream layer recovered from an emulsion prepared with  $\beta$ -conglycinin.

Table 4. Equilibrium Surface Tension of Each of  $\beta$ -Conglycinin Trimer

	Equilibrium Surface Tension (mN/m)
B <sub>0</sub>	48.1
B <sub>1</sub>	50.1
B <sub>3</sub>	50.3
B <sub>5</sub>	49.9

Surface tension of 0.05%  $\beta$ -conglycinin trimer in 0.01 M Tris-HCl buffer was measured for 60 min using a Wilhelmy plate type surface tensiometer, and the value at 60 min was defined as equilibrium surface tension.

率が高い傾向を示したことから、油滴界面への吸着性に差異のあることが予測されたが、とくに吸着しやすいサブユニットは認められなかった。

$\beta$ -コングリシニンについては、乳化前に67.5%であった $\alpha$ 系サブユニットが乳化後には76.5%に増加しており、 $\beta$ サブユニットよりも $\alpha$ 系サブユニットの方が油滴に吸着しやすいという結果が得られた。

$\beta$ -コングリシニン溶液を乳化し、油滴界面に吸着している $\beta$ -コングリシニンにキモトリプシンを作用させた結果をFig. 9に示した。油滴界面に吸着した未分解 $\beta$ -コングリシニンには(レーン3)、未分解・未乳化の $\beta$ -コングリシニン(レーン1)に比べ、 $\alpha$ 系サブユニットが多く含

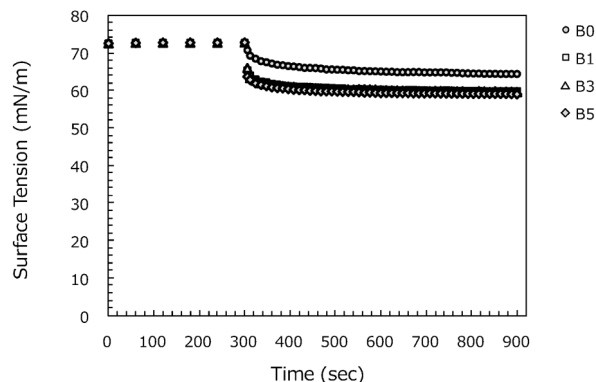


Fig. 10. Time-dependency of Surface Tensions of  $\beta$ -Conglycinin Trimers.

Surface tension was recorded immediately using a Wilhelmy-plate type surface tensiometer after 20  $\mu$ L of a protein solution were gently infused below the surface of 5 mL of 0.01 M Tris-HCl buffer containing 0.5 M NaCl (pH8.0).

まれており、先の結果と同様、 $\alpha$ 系サブユニットの方が油滴界面に吸着しやすかった。一方、油滴界面に吸着した $\beta$ -コングリシニンにキモトリプシンを作用させた場合(レーン4)は、分解によって生じたフラグメントもわずかに認められるものの、吸着未分解 $\beta$ -コングリシニン(レーン3)とほぼ同様の泳動パターンを示し、溶液状態で分解した未乳化の $\beta$ -コングリシニンの泳動パターン(レーン2)とは異なっていた。

#### 4) $\beta$ -コングリシニン分子種の表面張力

$\beta$ -コングリシニン各分子種の平衡表面張力を測定した結果をTable 4に示したが、分子種間に大きな差異はなかった。一方、0.01 M トリス-塩酸緩衝液の表面張力を5分間測定後、緩衝液表面に1%各分子種溶液20  $\mu$ Lを静かに注入し、その後の表面張力値の経時変化を計測した結果をFig. 10に示した。B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>は、ほぼ同様の表面張力の経時変化を示したのに対し、B<sub>0</sub>では低下の度合いが低かった。

#### 4. 考察

大豆タンパク質の主要成分の一つである $\beta$ -コングリシニンは、3種類のサブユニット $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ からなる3量体糖タンパク質で、サブユニットの組み合わせから、現在までにB<sub>0</sub>~B<sub>6</sub>コングリシニンの存在が知られている。今回、 $\beta$ -コングリシニンの乳化機能発現における各分子種および構成サブユニットの寄与について、B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>コングリシニンの乳化活性、油滴界面への吸着率、吸着サブユニット成分、表面疎水性、および表面張力の測定を行って検討した。

$\alpha$ 系サブユニットの存在比が高くなると乳化活性も高まり、溶液状態の各分子種を用いた以前の結果<sup>12)</sup>を支持す

るものであった。また、油滴界面への吸着性も $\alpha$ 系サブユニットが多く含まれるほど高まった。吸着率については $B_3$ と $B_5$ の間に約16%の差があったが、乳化活性はほぼ同じ値を示したことから、乳化活性の点では $\alpha$ 系サブユニットが2つ含まれることが重要と考えられた。

Maruyamaらは、 $\alpha$ 欠失、 $\alpha'$ 欠失、 $\alpha\alpha'$ 欠失大豆からホモトライマーを調製し、それらの乳化性について評価した。その結果、 $\alpha$ ホモトライマーから調製したエマルジョンの平均油滴径は $5.2\ \mu\text{m}$ 、 $\alpha'$ ホモトライマーは $9.8\ \mu\text{m}$ であったのに対し、 $\beta$ ホモトライマーでは $28.5\ \mu\text{m}$ となり、 $\alpha$ 系サブユニットのみからなる分子種の乳化性が優れることを報告している<sup>23)</sup>。さらにMaruyamaらは、ヘテロ3量体から調製したエマルジョンの平均粒径も測定したところ、 $\alpha 2\beta 1$ は $4.9\ \mu\text{m}$ 、 $\alpha' 2\beta 1$ は $8.6\ \mu\text{m}$ 、 $\alpha 1\beta 2$ は $19.9\ \mu\text{m}$ 、 $\alpha' 1\beta 2$ が $26.1\ \mu\text{m}$ となり、今回の結果と同様、 $\alpha$ 系サブユニットを2つ含むヘテロトライマーの粒径はそれぞれのホモトライマーの粒径に、 $\beta$ サブユニットを2つ含むヘテロトライマーの粒径は $\beta 3$ ホモトライマーと近い値となることを明らかにしている<sup>24)</sup>。

$\beta$ -コングリシニンに1/250量のキモトリプシンを作用させると、分子量50k~47kダルトンの消化中間体として存在する (Fig. 5)。これらは、 $\beta$ -コングリシニンサブユニットのコア領域の分子量に近く、切断部位を明らかにしたうでの考察が必要ではあるが、キモトリプシンの基質となるアミノ酸残基 ( $\alpha'$ サブユニットの場合、エクステンション領域のPhe<sup>41</sup>, Phe<sup>43</sup>, Trp<sup>63</sup>, Trp<sup>100</sup>, コア領域のPhe<sup>150</sup>, Phe<sup>152</sup>, Phe<sup>157</sup>, Phe<sup>161</sup>, Tyr<sup>165</sup>,  $\beta$ サブユニットのN末端付近では、Phe<sup>11</sup>, Tyr<sup>12</sup>, Phe<sup>13</sup>, Phe<sup>15</sup>, Phe<sup>23</sup>) の配置などから<sup>9)</sup>、分解部位がエクステンション領域となっている可能性が高い。 $\beta$ -コングリシニンの乳化活性におよぼすキモトリプシン限定酵素分解の影響を、食塩非存在下で検討したところ (Fig. 6)、分解後5分で乳化活性が低下し始め、 $\alpha$ ,  $\alpha'$ サブユニットがほぼ分解を受け消化中間体となる分解60分以降は、ほぼ一定の値を示し、 $\beta$ -コングリシニンの乳化機能発現にとって、エクステンション領域が重要であることを示すものと考えられる。

ANSを用いて $\beta$ -コングリシニンの表面疎水性を評価したところ、疎水性アミノ酸の多い $\beta$ サブユニットを多く含む分子種よりも $\alpha$ 系サブユニットの多い分子種の表面疎水性が高く、吸着率の結果を反映していた。

Maruyamaらは、大腸菌発現系を用いて調製した、糖鎖の付加されていない組み換え型サブユニットのANSによる表面疎水性を測定し、 $\alpha' > \alpha > \beta$ の順で、とくに $\alpha'$ サブユニットの疎水性の高いことを報告しており<sup>25)</sup>、今回の結果と一致するものであった。Maruyamaらは、 $\alpha$ 系サブユニットのコア領域のみ表面疎水性も測定し、 $\alpha$ 系サブユニットの表面疎水性はコア領域によって決定されることを明らかにしている<sup>25)</sup>。Maruyamaらは、疎水性カラムを用いた解析も行ったが、ANSの結果と同様、 $\alpha$ 系サブ

ユニットを多く含む分子種の疎水性が高いことも報告している<sup>24)</sup>。

油滴界面に吸着したサブユニット成分をSDS電気泳動によって分析したところ、 $B_1$ ,  $B_5$ コングリシニンとも、乳化前後でサブユニット組成に変化はなかった。 $\beta$ -コングリシニンが油滴界面に吸着する際には、(1)乳化中にサブユニット構造が壊れ、サブユニットに解離してから油滴界面に吸着する、(2)乳化中にサブユニットに解離せず、サブユニット構造を保ったままの状態でお滴界面に吸着する、のいずれかのプロセスが考えられる。(1)のプロセスの場合は、吸着性の高いサブユニットが選択的に油滴界面に吸着するものと考えられ、 $\alpha$ 系サブユニットが多く吸着することが予測される。一方、(2)のプロセスの場合ならば、サブユニット間の吸着性に差が出ないものと考えられ、Table 3に示したように、とくに吸着しやすいサブユニットは認められなかったことから、 $\beta$ -コングリシニン分子種は、プロセス(1)のように解離してから吸着するのではなく、(2)のように、サブユニット構造を保ったままの状態でお滴界面に吸着する可能性が考えられた。さらに、Fig. 9の結果から、 $\beta$ -コングリシニンは油滴界面に多分子層の状態でお滴している可能性が考えられた。なお、 $B_3$ コングリシニンでは、乳化後、若干 $\alpha$ 系サブユニットが増加していたが、これは $B_3$ 画分に $B_2$ や $B_4$ 画分が混入し、 $\alpha 2\beta 1$ の $B_4$ の方が $\alpha 1\beta 2$ の $B_2$ よりも吸着しやすく、結果として $\alpha$ 系サブユニットの比率が増加したとも考えられる。

$\beta$ -コングリシニンを乳化した場合、 $\alpha$ 系サブユニットが多く吸着したが (Table 3)、これは、 $B_0 \sim B_6$ の中では、Table 1に示したように $\alpha$ 系サブユニットの多い $B_3 \sim B_6$ の方が吸着しやすく、 $\alpha$ ,  $\alpha'$ サブユニットの量比が高くなったものと考えられた。

$\beta$ -コングリシニンの界面活性の指標として、2種類の表面張力を測定した。平衡表面張力では分子種間に差異はなかった。非平衡表面張力については、 $B_0$ の表面張力低下の程度が低く、 $B_1$ ,  $B_3$ ,  $B_5$ コングリシニンはほぼ同じ挙動を示し、 $\alpha$ 系サブユニットの影響が大きいと考えられた。大豆タンパク質も含め4種の食品タンパク質の乳化性を比較したところ<sup>18)</sup>、カゼインの乳化活性がもっとも高く、タンパク質溶液注入後の表面張力低下速度ももっとも速かった。一方、中性pH下では、卵白アルブミンの乳化活性は最低であったが、酸性下ではカゼインに匹敵する乳化活性を示すようになり、界面形成後の表面張力変化もカゼインと同様の挙動を示すようになった<sup>18)</sup>。しかしながら、 $\beta$ -コングリシニンに関しては、界面形成後の表面張力低下速度と乳化特性とは、必ずしも相関はしなかった。

Sallehらは、欠失大豆からサブユニット組成の異なる $\beta$ -コングリシニンの加熱ゲル形成性について検討し、ゲル強度は $\alpha'$ 欠失コングリシニン $>$  $\beta$ -コングリシニン $>$  $\alpha$ 欠失コングリシニンの順となるものの、加熱後の2次構



造に3者間で差異はなかったとしており<sup>26)</sup>, このことと今回の非平衡表面張力測定結果とは関連している可能性も考えられた.

## 5. 要約

大豆  $\beta$ -コングリシニン分子種の B<sub>0</sub> ( $\beta$ 3), B<sub>1</sub> ( $\alpha$ '1 $\beta$ 2), B<sub>3</sub> ( $\alpha$ 1 $\alpha$ '1 $\beta$ 1), B<sub>5</sub> ( $\alpha$ 2 $\alpha$ '1) コングリシニンについて, 乳化活性, 油滴界面への吸着率, 吸着サブユニット成分, 表面疎水性, および表面張力の測定を行い, 乳化機能発現におよぼす各サブユニットの寄与について検討し, 以下の結果を得た.

- (1)  $\alpha$ ,  $\alpha'$  の  $\alpha$  系サブユニットを2個以上含む分子種の乳化活性が高かった. 一方, 吸着率と表面疎水性は  $\alpha$  系サブユニット含量とともに高くなった.
- (2) サブユニット間のアミノ酸配列の相同性が高いコア領域の N 末端側に結合したエクステンション領域の存在が乳化機能発現にとって重要であった.
- (3)  $\beta$ -コングリシニンは, サブユニット構造を保ったまま, 多分子層を形成しながら油滴界面に吸着するものと考えられた.
- (4) 平衡表面張力値は, 4分子種間で差異はなかった. また, 界面形成後の表面張力の低下速度も B<sub>0</sub> が遅かった以外, ほぼ同様の挙動を示し, 乳化特性との相関はなかった.

## 6. 引用文献

- 1) 星祐二, 菊地智子, 工藤晶子, 大豆  $\beta$ -コングリシニンのキモトリブシンによる限定酵素分解について, 宮城学院女子大学生生活科学研究所報告, **31**, 15-21 (1999).
- 2) 星祐二, 「大豆の機能と科学」, 小野伴忠, 下山田真, 村本光二編, 朝倉書店, 東京, p. 152-177 (2012).
- 3) 下山田真, 「大豆の機能と科学」, 小野伴忠, 下山田真, 村本光二編, 朝倉書店, 東京, p. 177-198 (2012).
- 4) T. Mori, T. Nakamura and S. Utsumi, Gelation mechanism of soybean 11S globulin: Formation of soluble aggregates as transient intermediates, *J. Food Sci.*, **47**, 26-30 (1982).
- 5) T. Nakamura, S. Utsumi and T. Mori, Network structure formation in thermally induced gelation of glycinin, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 349-352 (1984).
- 6) T. Nakamura, S. Utsumi, K. Kitamura, K. Harada and T. Mori, Cultivar differences in gelling characteristics of soybean glycinin, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 647-651 (1984).
- 7) T. Nakamura, S. Utsumi and T. Mori, Effects of temperature on the different stages in thermal gelling of glycinin, *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 1201-1203 (1985).
- 8) 鎌田慶郎, 「大豆の機能と科学」, 小野伴忠, 下山田真, 村本光二編, 朝倉書店, 東京, p. 31-39 (2012).
- 9) N. Maruyama, T. Katsube, Y. Wada, M. H. Oh, A. P. Barba de La Rosa, E. Okuda S. Nakagawa and S. Utsumi, The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean  $\beta$ -conglycinin in folding, assembly and structural features, *Eur. J. Biochem.*, **258**, 854-862 (1998).
- 10) V. H. Thanh and K. Shibasaki, Heterogeneity of beta-conglycinin, *Biochimica et Biophysica Acta*, **439**, 326-338 (1976).
- 11) F. Yamauchi, M. Sato, W. Sato, Y. Kamata and K. Shibasaki, Isolation and identification of a new type of  $\beta$ -conglycinin in soybean globulins, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2863-2868 (1981).
- 12) Y. Hoshi, S. Ara and Y. Ishii (1992), Emulsifying activities of soybean  $\beta$ -conglycinin isomers, *Annual Report of the Institute of Living Science of Miyagi Gakuin Women's College*, **24**, 14-17 (1992).
- 13) 星祐二, 佐々木尚子, 結城香代子, 大豆  $\beta$ -コングリシニンの乳化特性におよぼすトリブシンによる限定酵素分解の影響, 宮城学院女子大学生生活科学研究所報告, **25**, 6-12 (1993).
- 14) U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 15) 星祐二, 大豆  $\beta$ -コングリシニンヘテロジェニティのより簡便なる分離法について, 宮城学院女子大学生生活科学研究所報告, **19**, 1-8 (1987).
- 16) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 17) D. R. Cameron, M. E. Weber, E. S. Idziak, R. J. Neufeld and D. G. Cooper, Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 655-659 (1991).
- 18) 星祐二, 超音波により乳化した食品タンパク質 (4種) エマルションの界面化学的特性について, 宮城学院女子大学生生活科学研究所報告, **41**, 13-20 (2009).
- 19) 星祐二, コンピュータ接続デンストメトリーシステムの製作, 宮城学院女子大学生生活科学研究所報告, **23**, 10-17 (1991).
- 20) 小川泰史, 山内文男, 超音波処理と濁度による大豆蛋白質乳化性の微量測定法, 日本食品工業学会誌, **27**, 631-634 (1980).

- 21) 星祐二, 荒須美江, 石井靖子, 大豆 B<sub>6</sub>-コングリシニンの乳化活性におよぼすトリプシン処理の影響について, 宮城学院女子大学生生活科学研究報告, **24**, 30-35 (1992).
- 22) 山内文男, 大豆タンパク質の構造と食品物性, 日本食品工業学会誌, **26**, 266-277 (1979).
- 23) N. Maruyama, M. R. M. Salleh, K. Takahashi, K. Yagasaki, H. Goto, N. Hontani, S. Nakagawa and S. Utsumi, The effect of the N-linked glycans on structural features and physicochemical functions of soybean  $\beta$ -conglycinin homotrimers, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 139-144 (2002).
- 24) N. Maruyama, M. R. M. Salleh, K. Takahashi, K. Yagasaki, H. Goto, N. Hontani, S. Nakagawa and S. Utsumi, Structure-physicochemical function relationships of soybean  $\beta$ -conglycinin heterotrimers, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4323-4326 (2002).
- 25) N. Maruyama, R. Sato, Y. Wada, Y. Matsumura, H. Goto, E. Okuda, S. Nakagawa and S. Utsumi, Structure-physicochemical function relationships of soybean  $\beta$ -conglycinin constituent subunits, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 5278-5284 (1999).
- 26) M. R. M. Salleh, N. Maruyama, K. Takahashi, K. Yagasaki, T. Higasa, Y. Matsumura and S. Utsumi, Gelling properties of soybean  $\beta$ -conglycinin having different subunit composition, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1091-1096 (2004).