

# 卵白・大豆タンパク質複合凝集体形成に着眼した 新規物性素材の開発

東京農業大学応用生物科学部 農芸化学科 食料資源理化学研究室・教授 辻井 良政

## ■ 緒言

卵白は主成分がタンパク質であり、食品タンパク質の中では優れた加熱ゲル化機能を有する<sup>1)</sup>。すなわち他の食品タンパク質と比較して、低濃度で、また低い温度でゲルを形成し、そのゲルの物性(硬さ、弾力性、復元性)や保水性も優れている。液卵白を噴霧乾燥し、乾熱処理して製造される乾燥卵白製品は、さらに優れた加熱ゲル化機能を持つことが知られているが<sup>2)</sup>、乾熱処理中に形成されるタンパク質の凝集体がその機能発現を担っていることが解明されている<sup>3)</sup>。

一方、大豆から抽出される大豆タンパク質は、加熱ゲル化機能が弱く、卵白と同じタンパク質濃度で、卵白が十分にゲル化する加熱条件でもゲルを形成しない。なお、世の中に流通している大豆タンパク質製品は、予め抽出液の加熱処理によりタンパク質をある程度変性させて凝集体を形成させることにより、一定レベルのゲル化機能が付与されているが<sup>4)</sup>、それでも卵白製品の加熱ゲル化機能には程遠い。

そこで、大豆タンパク質のさらなるゲル化機能向上には、卵白タンパク質の特性付与が有効であると仮説を立て、従来にないユニークで優れた加熱ゲル化機能を持つ素材、すなわち卵白・大豆タンパク質複合凝集体を開発することを目的とした。本研究では、最適な複合凝集体形成条件(加熱条件など)の探索を、加熱ゲルの物性評価とタンパク質分子の挙動解析と併せて行った。

本研究は、ユニークで優れた加熱ゲル化機能を持つ低コストの卵白・大豆タンパク質素材を開発し、畜肉代替品の食感改良、中華麺の新規食感創出やゆで伸び防止、冷凍食品の保水性向上、畜肉加工品の結着性向上など幅広い場面で応用され、特に畜肉代替品の消費拡大により地球環境維持に貢献していくことを目指す。

## ■ 方法

### 1. 試料と実験サンプル調製方法

キューピータマゴ株式会社より供与された乾燥卵白(pH7.0)と、大豆(とよまさり)を試料として用いた。大豆タンパク質の調製は古川と太田の方法に従った<sup>4)</sup>。大豆を一晩浸漬後、フードカッターにて磨砕し、遠心分離(10,000 g、15分、室温)後、上清をpH 4.5に調整し、再び遠心分離(10,000 g、15分、室温)した沈殿を大豆タンパク質画分として回収した。乾燥卵白と大豆タンパク質画分をそれぞれ純水に溶解(分散)し、純水に対して透析脱塩し、pH調整した。溶液(分散液)の固形分含量を水分計を用いて測定し、固形分濃度3%に調整した。各サンプル(卵白単体、大豆単体、卵白と大豆1:1)について、加熱処理(10分間)および未処理の試料を作製し、凍結乾燥粉末を実験試料とした。

### 2. 加熱ゲル調製方法および評価方法

実験試料の固形分が14%になるように溶液(分散液)を調製した。調製した溶液を2mLチューブに分注し、90°C、30分間の加熱によりゲル化させ、厚さ7mmに切り出し、テンシプレッサー MyBoy II (タケトモ電機株式会社)にて直径5mmの球状プランジャーを用いて破断試験を行った。

### 3. 電気泳動

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli(1970)の方法<sup>5)</sup>を一部改変して行った。タンパク質溶液の半量の8M尿素、60%グリセロール、3% SDS、50mM DTT(還元の場合はあり、非還元の場合はなし)、および0.01%ブロモフェノールブルーを含有する60.6mM Tris-HCl(pH6.8)と混合し、24時間室温で静置しサンプル溶液を調製した。サンプル溶液を5-20%グラジエントゲル e-pagel(アトー株式会社)にアプライし、電気泳動に供した。分子量マーカーには XL-ladder broad(株式会社アンテグラル)を使用した。

### 4. 粒度分布測定

実験試料の5%純水分散液を調製し、粒度分布計(SALD-2300、株式会社島津製作所)にて粒度分布を測定し、体積平均径を求めた。

## ■ 結果

### 1. 予備実験

卵白単体、大豆単体、および卵白と大豆1:1混合品につき、加熱処理(固形分3%、pH9.0、80°C×10分)なしとありで加熱ゲルの物性を評価した(図1)。加熱処理なしの場合は、大豆はゲル化せず液状のままであったため測定不能であった。卵白は高い破断荷重を示したが、1:1混合品では破断荷重は8分の1程度まで低下した。一方、加熱処理ありの場合は、大豆ではゲル化したが、卵白の破断荷重は加熱処理なしと比べ低下した。1:1混合品では加熱処理なしと比べ破断荷重は大幅に増加した。破断距離についても破断荷重と同様の傾向が認められた。以上より、卵白と大豆の混合品については加熱処理がゲル化性を向上させるためには有効であることが明らかとなった。

実験試料を電気泳動分析した結果を図2に示す。非還元の場合、卵白、大豆、および1:1混合品につき、加熱処理によりタンパク質分子が重合し、高分子領域にスミアなバンドが出現し、さらにゲル上部にゲルに入りきらない重合体バンドが出現した。それらのバンド強度は1:1混合品が単体のものよりも強く、混合したことでタンパク質の相互作用が強くなり多くの凝集体が形成されたことが示唆された。還元の場合、卵白、大豆、および1:1混合品につき、加熱処理有無の差は認められなかった。以上より、すべての試料につき、加熱処理により、タンパク質分子がジスルフィド結合により重合していること、また、ジスルフィド結合以外の共有結合による重合はほとんど起きていないことが明らかとなった。

### 2. 加熱処理最適条件の探索

加熱処理の温度を、室温(加熱処理なし)、80°C、90°C、pHを8.0、9.0、10.0とした場合の卵白、大豆、および1:1混合品のゲル物性の結果を示す(図3)。加熱処理の効果は80°Cの方が90°Cに比べ高かった。またpHの影響については、加熱処理なしの場合はほとんど認められなかったが、80°Cおよび90°Cの場合はpHが高い方が加熱処理の効果が高かった。破断距離についても破断荷重と同傾向が認められた。本試験の結果、pH10.0、80°Cが最適の加熱処理条件であり、その場合加熱ゲルの破断荷重は2倍となった。

実験試料の電気泳動分析結果を図4に示す。非還元と還元の結果から、図2と同様にすべての加熱処理区においてジスルフィド結合によるタンパク質の重合が起きていることが明らかとなった。加熱処理の温度やpHの違いによる顕著な差は認められなかった。

### 3. 卵白タンパク質と大豆タンパク質の相互作用

平均粒子径は、pH 8.0においては、すべての温度での加熱処理により有意に大きくなったが、pH 9.0、10.0においては加熱処理による有意差は認められなかった(図5)。温度の影響については、80°Cが85°Cと90°Cと比較して小さくなる傾向を示した。また、すべての温度において、pHが高くなるほど平均粒子径が小さくなる傾向が認められた。

卵白単体、大豆単体、および1:1混合品につき、それぞれ3%溶液(pH9.0)の50°Cから90°Cまで5°C刻みで加熱した時の非還元電気泳動分析の結果を図6に示す。昇温に伴うバンド消失、すなわち分子間のジスルフィド結合形成は、卵白のオボアルブミンにおいて1:1混合品(75°C)の方が卵白単体(80°C)よりも起きやすく、卵白のオボトランスフェリンは逆に卵白単体(55°C)の方が1:1混合品(60°C)より起きやすかった。大豆タンパク質においては単体と混合品で顕著な違いは認められなかった。以上より、卵白と大豆を共存させて加熱すると、特に卵白タンパク質において単体とは異なる挙動をすることが確認され、それらタンパク質の相互作用が示唆された。

## ■ 考察

卵白タンパク質と大豆タンパク質の混合品のゲル形成能を向上させるためにはタンパク質分子の凝集体形成がキーファクターと考えられる。タンパク質の相互作用の様式には共有結合の他に疎水の相互作用(疎水結合)、イオン結合、水素結合などが知られている。本研究においては、電気泳動分析よりジスルフィド結合を中心とした共有結合によるタンパク質分子間相互作用を、また平均粒子径測定によりすべての様式を包含したタンパク質分子間相互作用を解析した。

最適条件の探索の結果、加熱処理はpH10.0で80°Cで行うことが最適であることがわかった。タンパク質分子間のジスルフィド結合の形成はpHと温度が高い方が起きやすいことが知られている。加熱処理の温度が90°Cの場合は分子間のジスルフィド結合の形成が過剰でありゲル化時にタンパク質分子が十分な構造変化(アンフォールディング)ができなかった可能性が考えられる。ただし、電気泳動分析では他の加熱処理条件との顕著な差が認められず、重合度とゲル強度の関係性は考察できなかった。

そこで平均粒子径を測定した結果、平均粒子径が小さいほどゲル強度が高くなる傾向が認められた。タンパク質は pH が高くなるほど分子表面の負荷電が強くなり、タンパク質分子同士の反発力が大きくなり相互作用がしにくくなる。一方、前述したように pH が高くなるほどタンパク質分子間のジスルフィド結合は形成されやすくなる。本研究から、pH10.0、80°Cの条件下では、それらが適度にバランスが取れており最も小さな凝集体を形成したものと推察された。

## ■ 要 約

卵白タンパク質と大豆タンパク質を混合し、固形分含量 3%の純水分散液を加熱処理 (pH 10.0、80°C、10 分) することにより、未加熱と比較して 2 倍の破断強度の加熱ゲルを得ることができた。また、最適なゲル強度を得るためにはタンパク質の凝集制御が重要であることがわかった。

## ■ 文 献

- 1) Akihiro Handa, Keiko Takahashi, Namio Kuroda, Glenn W. Froning(1998)Heat-induced egg white gels as affected by pH. *J Food Sci*, 63, 403-407.
- 2) Akihiro Handa, Kenji Hayashi, Hiroyuki Shidara, Namio Kuroda(2001)Correlation of the protein structure and gelling properties in dried egg white products. *J Agric Food Chem*, 49, 3957-3964.
- 3) Shota Koyama, Yuko Nemoto, Masahiro Ichikawa, Daiki Oka, Yoshimasa Tsujii, Tomohiro Noguchi, Katsumi Takano, Akihiro Handa(2021)Effects of suppressing protein structural changes on the excellent gelling properties of dried egg white via dry-heat treatment. *Food Sci Tech Res*, 27, 293-300.
- 4) 古川忠康、太田恵教(1981)大豆蛋白質のゲル形成性ならびに保水性に及ぼす加熱変性の影響。日本食品科学工学会誌、28、451-456
- 5) Laemmli, U. K.(1970)Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

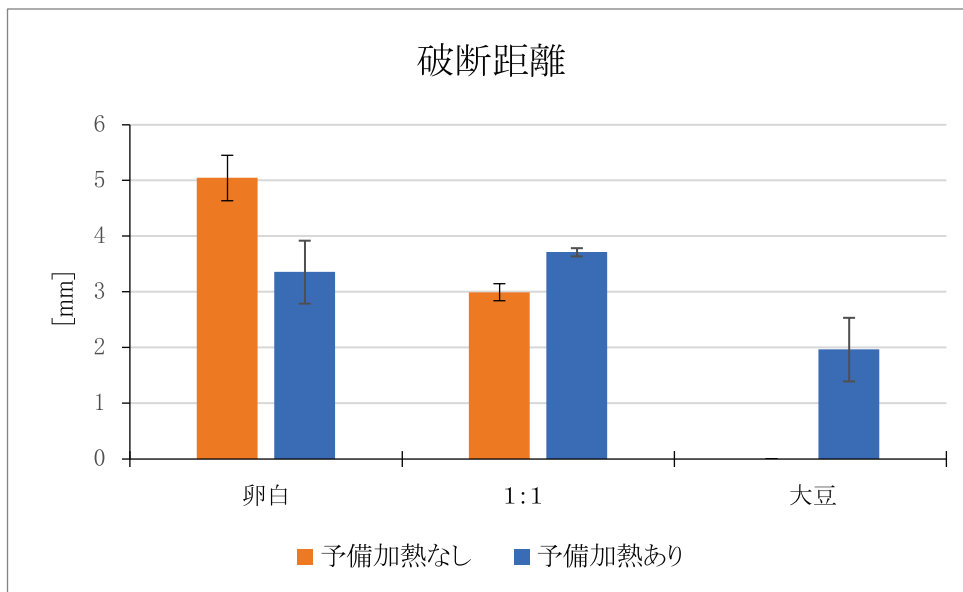
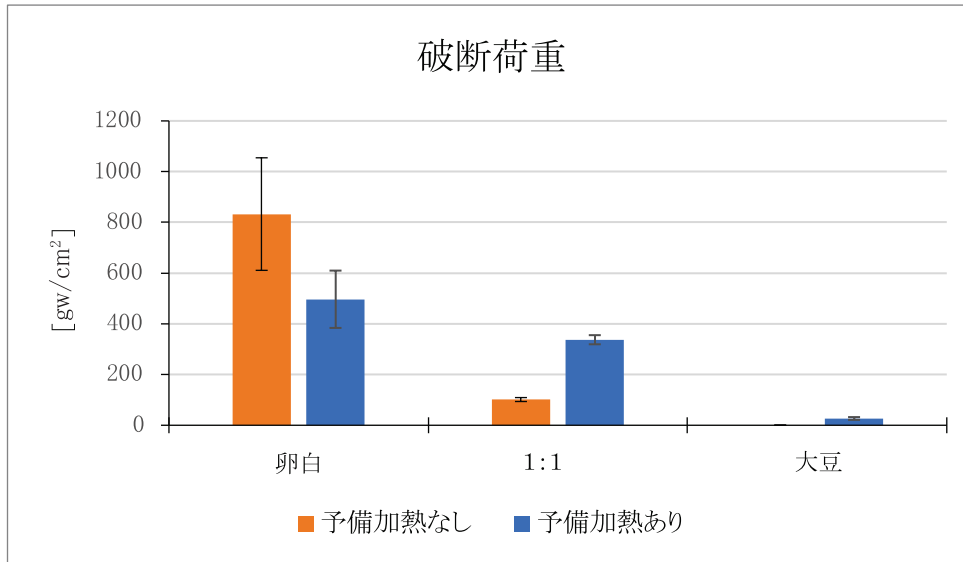


図1 卵白単体、大豆単体、1：1混合品の加熱ゲル破断物性

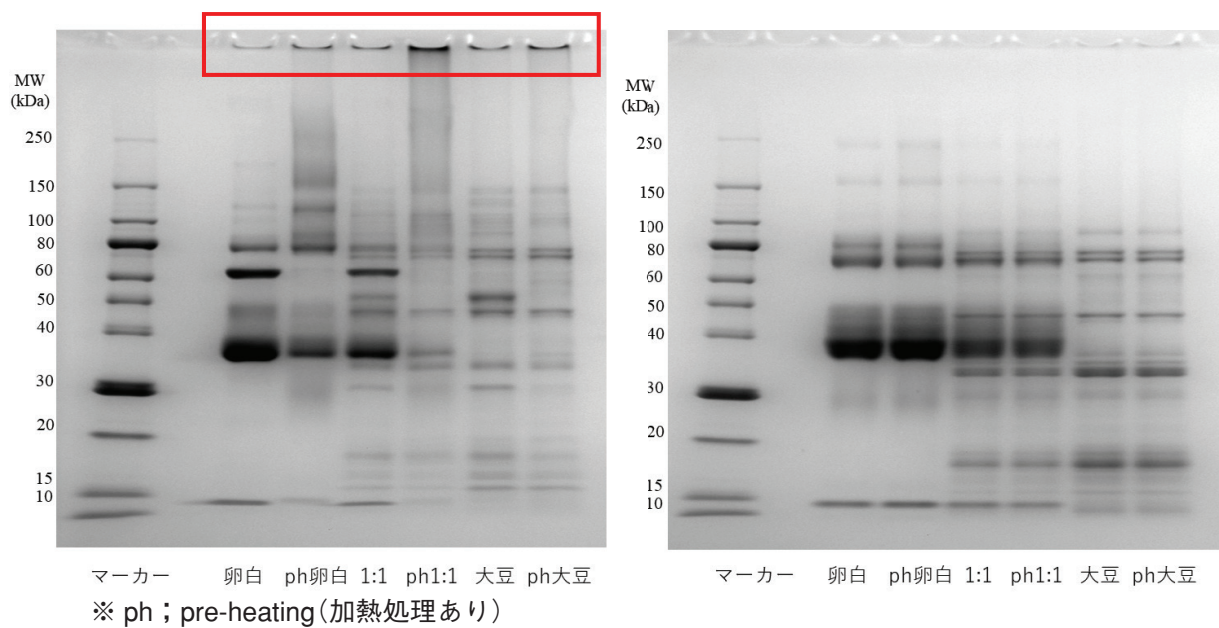
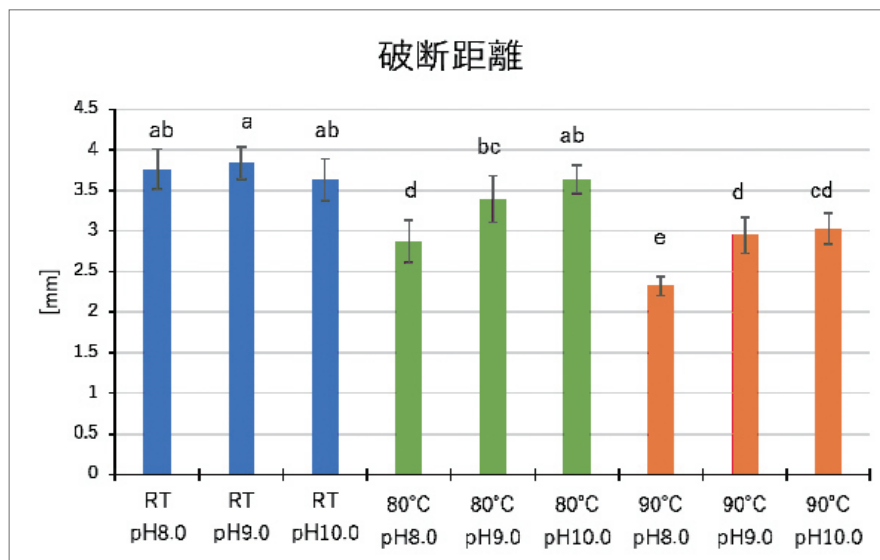
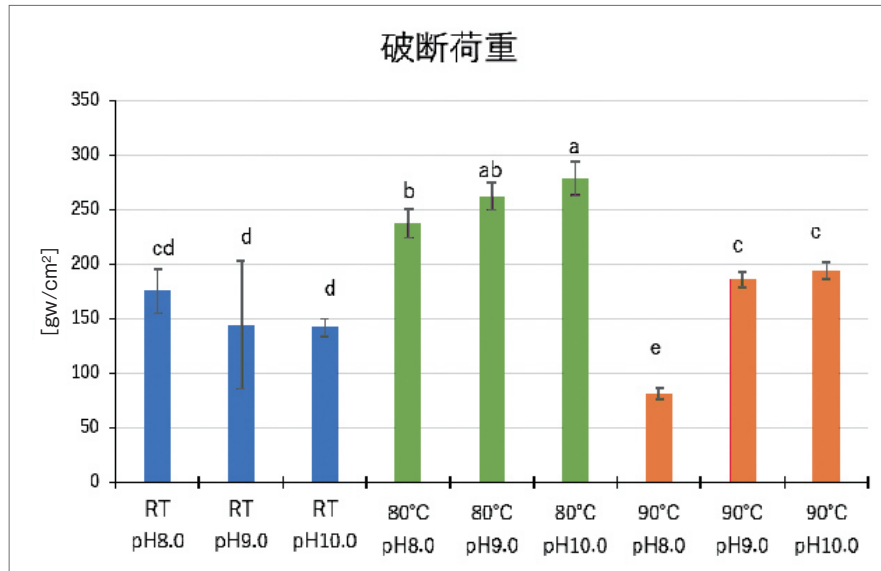


図2 電気泳動による加熱処理時のタンパク質の凝集挙動解析(左;非還元、右;還元)  
赤枠はタンパク質の重合体



※ RT ; room temperature (加熱処理なし)

図3 加熱処理時の温度と pH が及ぼす加熱ゲル破断特性への影響  
 Tukey-Kramer の検定  
 異符号間に危険率 < 0.01 で有意差あり

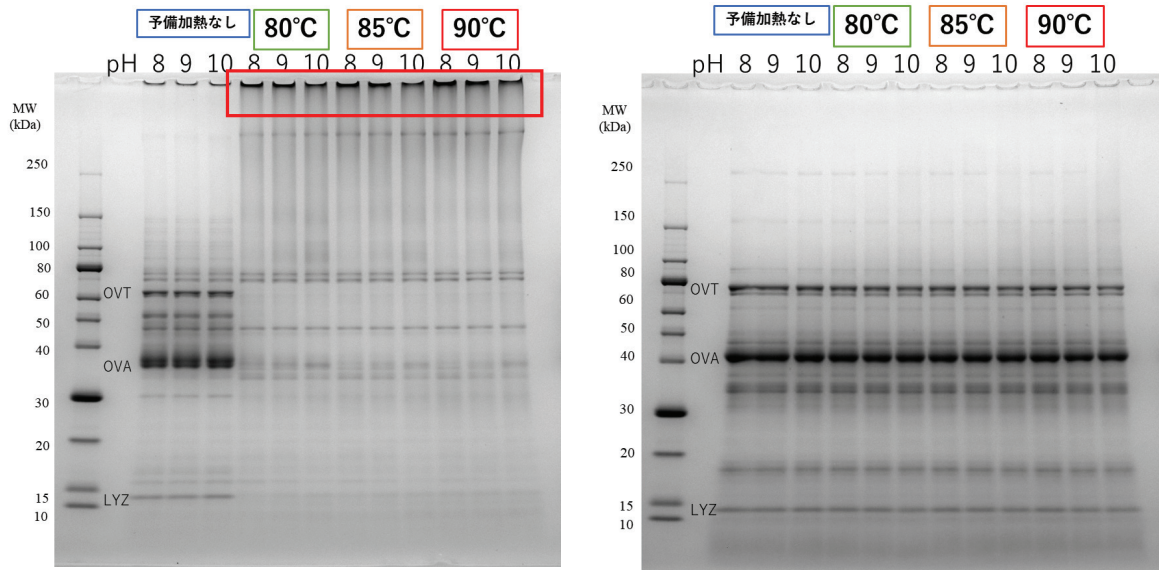
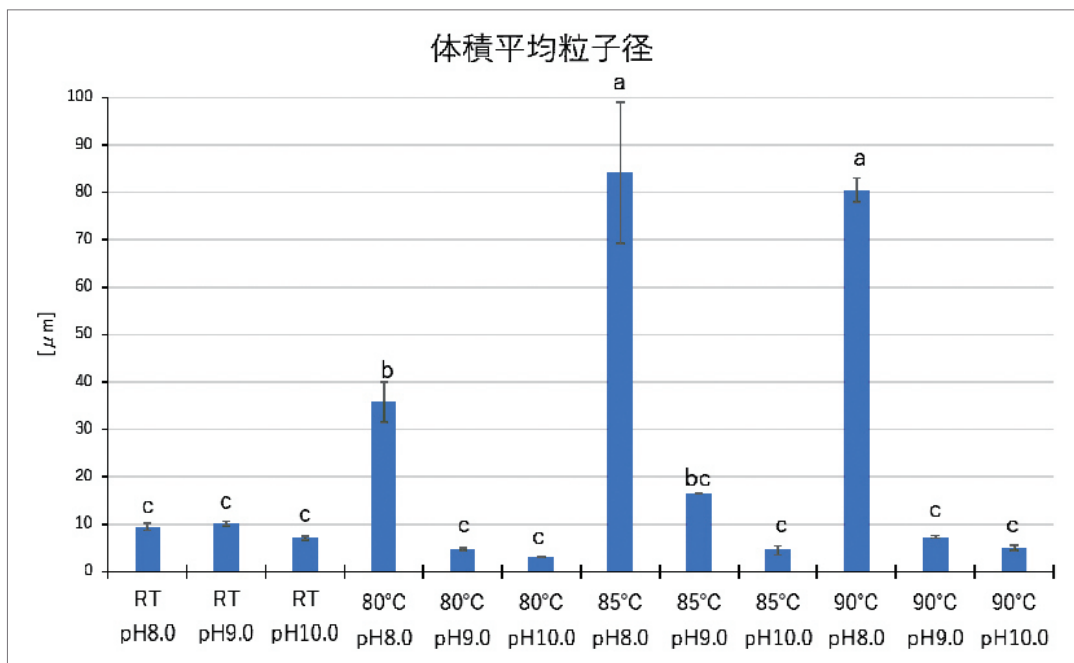


図4 電気泳動による加熱処理条件を変えた時のタンパク質の凝集挙動解析  
 (左; 非還元、右; 還元)  
 赤枠はタンパク質の重合体



※ RT ; room temperature (加熱処理なし)

図5 タンパク質凝集体の平均粒子径に及ぼす pH と加熱処理温度の影響  
 Tukey-Kramer の検定  
 異符号間に危険率 <0.01 で有意差あり

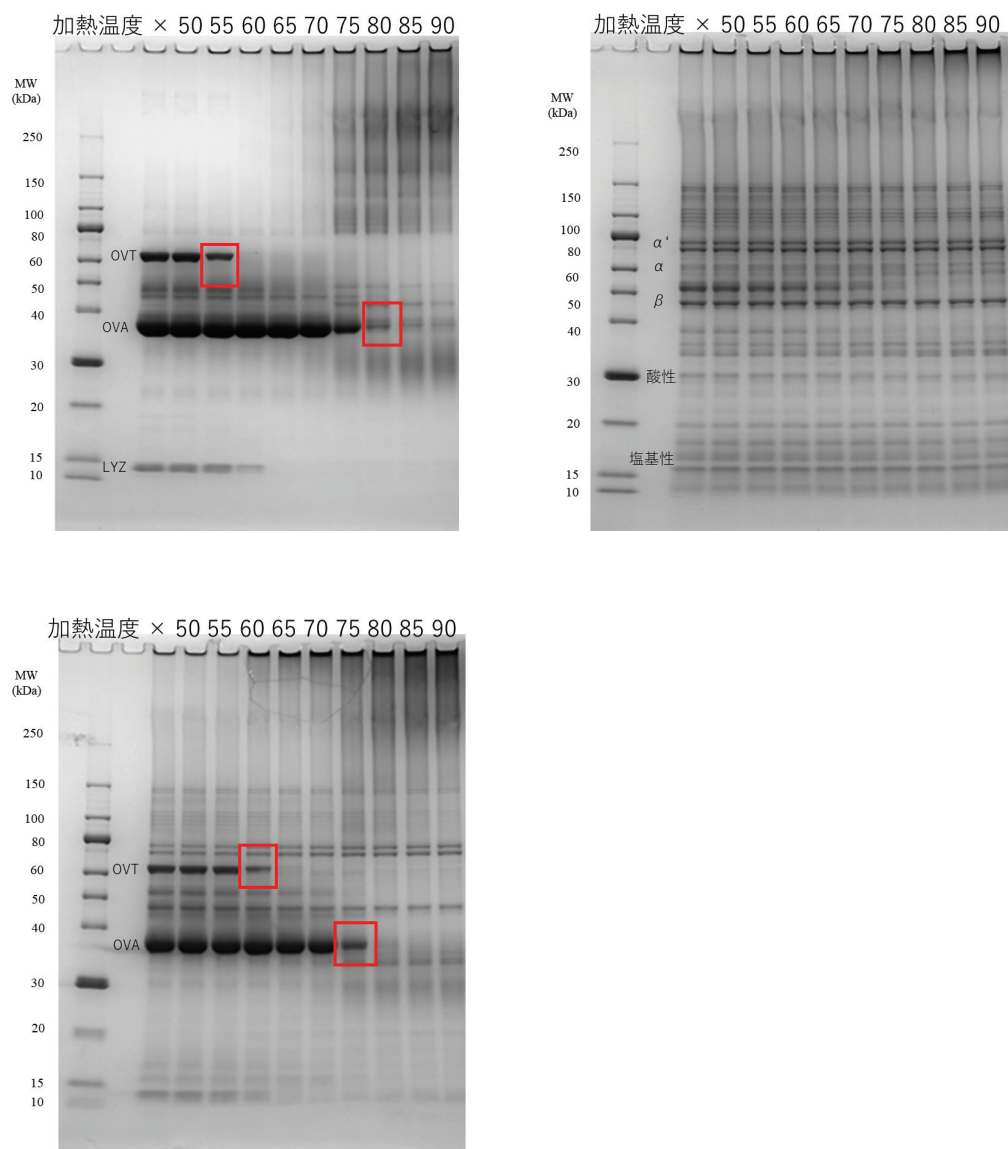


図6 電気泳動による卵白、大豆、および1:1混合品の昇温加熱時のタンパク質の凝集挙動解析  
 (左上; 卵白、右上; 大豆、下; 1:1 混合品)  
 (OVT; オボトランスフェリン、OVA; オボアルブミン、LYZ; リゾチーム)  
 赤枠は重合開始がはっきり認識できるバンド  
 X: 未加熱