

# 大豆たんぱく質の酵素分解に及ぼすグアーガムの影響

吉村 美紀<sup>1</sup>、原口 朋子<sup>2</sup>、加藤 陽二<sup>3</sup>、船見 孝博<sup>4</sup>

1 人間環境部門、2 環境人間学研究科、3 社会環境部門、4 三栄源エフ・エフ・アイ

## Influence of Guar Gum on the Enzymatic Degradation of Soy Protein Isolate

Miki YOSHIMURA, Tomoko HARAGUCHI, Yoji KATO and Takahiro FUNAMI

<sup>1-3</sup> School of Human Science and Environment,  
University of Hyogo

1-1-12 Shinzaike-honcho, Himeji, 670-0092 Japan

<sup>4</sup> Saneigen F・F・I

**Abstract:** Guar Gum (GG) is hydrated in water and appears viscosity. It has been demonstrated in various studies that GG was not affected by human digestive enzymes. The influence of GG on the enzymatic reaction of soy protein isolate (SPI) by pancreatin was studied using rheological measurements and BCA method (bicinchoninic acid protein assay). On adding the enzyme to SPI dispersion, the storage modulus decreased with time, and attained to plateau value with the lapse of time. The degradation for mixtures of SPI and GG in the presence of pancreatin occurred slowly with time and the rate constant of SPI degradation decreased by the addition of GG. By the rheological measurement and BCA method, we found that the degradation for the mixture with low molecular weight and high concentration GG5 proceeded more slowly than that with high molecular and low concentration GG3.

**Key words:** Guar Gum, soy protein isolate, viscosity, enzymatic degradation

### 緒言

水溶性の食物繊維は健康に有益な種々の効果をもつことが知られているが、多くは水に分散し増粘剤、乳化剤、安定剤などの目的で加工食品に使用されている<sup>1,3)</sup>。本研究で用いたグアーガムは、グアー豆の胚乳部から得られた水溶性の多糖類で、水に分散し粘度を発現する。血糖値上昇抑制作用、コレステロール低下作用、便秘改善作用効果が知られ、血糖上昇が抑制されたことが報告されている<sup>4)</sup>。同様に、植物性タンパク質である大豆タンパク質も、血中コレステロールの低下作用、肥満の改善効果など生活習慣病に対する機能性があることが報告されている<sup>5,6)</sup>。大豆は、畑の肉とも言われ、注目されているタンパク源であり、その大豆を加工した粉末状分離大豆

タンパク質は水産練り製品、ハム、ソーセージなどの副原料として、また粘性、乳化性などの機能性を利用して食感改良剤として、スープ、マヨネーズなどの加工食品に広く用いられている<sup>5,6)</sup>。

食物繊維は小腸での栄養素の消化・吸収速度に影響を与えると言われていたが、タンパク質においてもその消化・吸収率を減少させることが報告されている<sup>7-11)</sup>。これまで、レオロジー的手法により水溶性食物繊維の添加によって、大豆タンパク質の消化・吸収にかかわるパンクレアチン活性が抑制されることを報告した<sup>12,13)</sup>。このパンクレアチンによる分離大豆タンパク質の分解反応は、混合する食物繊維の種類によって異なり、混合する食物繊維溶液の見かけの粘度が影響することを考察した<sup>13)</sup>。

さらに、食物繊維ハイドロコロイドとして粘度の異なるコンニャクグルコマンナンを用い、分離大豆タンパク質の分解に対する影響を調べた結果、ゼロずり粘度における比粘度が 10mPa・s、20mPa・s、30mPa・s のいずれにおいても酵素反応を遅延したが、その効果に有意な差が認められない結果となった<sup>14)</sup>。そこで、本研究では、重量平均分子量の異なるグアーガムを用いて、ゼロずり粘度を 30mPa・s と一定値とした場合の分離大豆たんぱく質のパンクレアチンによる分解に対するグアーガムの影響を調べることを目的とした。

## 実験方法

### 1) 試料

グアーガム (以下、GG と示す。) は三栄源 F・F・I (株) において分子量分布の異なるもの 2 種 (以下 GG3、GG5 と示す。) を精製した。SEC-MALLS (サイズ排除クロマトグラフィー多角度光散乱検出器) により重量平均分子量を測定した。GG3 の重量平均分子量  $M_w$  は  $20.1 \times 10^5$  g/mol、多分散性指数  $M_w/M_n$  は 1.90 を示した。GG5 の重量平均分子量  $M_w$  は  $12.2 \times 10^5$  g/mol と多分散性指数  $M_w/M_n$  は、1.59 を示した。多分散性があるので分子量の重なる範囲もあるが、GG3 の方が GG5 に比べて高分子ものを多く含むグアーガムとなった。分離大豆タンパク (以下 SPI と示す。) としてニューフジプロ—SE 粉末状植物性たん白 (不二製油株式会社、泉佐野市) を用いた。パンクレアチン酵素として用いたパンクレアチン F (天野エンザイム株式会社、名古屋市) は、動物の膵臓から抽出され、アミラーゼ活性、プロテアーゼ活性、リパーゼ活性をもち、タンパク消化力は 1g 当たり 26,000units 以上である。酵素活性と安定性が高い pH7 で測定を行った。

### 2) 粘度のずり速度依存性による比粘度

脱イオン水にそれぞれ GG を溶解し、GG3 水溶液と GG5 水溶液 (濃度は 0.01~0.5 w/v% とする) を調製した。歪制御型レオメータ ARES (TA Instruments Japan Inc.、東京) を用いて、測定温度は 25°C とし流動曲線を求めた。ずり速度を  $0 \text{ s}^{-1}$  から  $500 \text{ s}^{-1}$  まで増加させた後、 $500 \text{ s}^{-1}$  から  $0 \text{ s}^{-1}$  まで減少させた。ずり速度の増加速度および減少速度は、いずれも  $200 \text{ s}^{-1}/\text{min}$  とした。治具は円錐-平板型 (円錐アングル 0.04 rad、直径 50 mm、ギャップ 0.05 mm) を用いた。求めた流動曲線により、溶媒粘度  $\eta_s$  とずり速度ゼロに外挿した場合の溶液粘度  $\eta_0$  から、ゼロずり速度における比粘度 ( $\eta_{sp}$ )<sub>0</sub> を求めた。測定は 3 回繰り返し、再現性を確認した。

### 3) 動的粘弾性の時間依存性

SPI 単独系は、脱イオン水 8.5 g に SPI 1.5 g を攪拌混合し全体量を 10.0 g とした。SPI・GG 混合系は、脱イオン水に GG を微量攪拌混合して溶解した後、SPI 1.5g を攪拌混合し全体量を 10g とした。GG の混合量は、ゼロずり速度における比粘度から、30mPa・s とする濃度をそれぞれ求めたものを使用した。パンクレアチンは 0.2M HEPES buffer 溶液と 2M NaCl 溶液で調製した HEPES buffer ストック液に分散させたものを 2g 添加した。最終濃度は 0.33 w/v% とした

レオウィン HAAKE Rheostress 600 (Thermo Electron Corporation、東京) を用いて、測定温度は 37°C、歪 0.05、1 Hz の周波数において動的粘弾性の時間依存性を求めた。SPI 単独系および SPI・GG 混合系にパンクレアチン酵素溶液を添加し、3 分 ( $t=180\text{s}$ ) 間保持した後に測定を開始した。貯蔵弾性率  $G'$  の時間依存性を 30 分間 ( $t=1,800\text{s}$ ) 測定した。治具は平板型 (直径 35 mm、ギャップ 0.1 mm) を用いた。

### 4) BCA 法 (bicinchoninic acid protein assay)

SPI 単独系および SPI・GG 混合系にパンクレアチン酵素を添加し、2、4、6、10、30、60、90 分後の試料から、各  $200 \mu\text{L}$  ずつをエッペン管に入れた。試料は直ちに氷水につけて、パンクレアチン酵素反応をとめた。マイクロ冷却遠心機 3,700 (KUBOTA、大阪市) を用いて、4°C、14,000 g で 5 分間遠心し、上清を回収した。この操作を 2 回繰り返した後、10 倍希釈し、マイクロコン YM30 (MILLIPORE) に移し、マイクロ冷却遠心機 3700 を用いて限外ろ過を行った。この限外ろ過試料と BSA (bovine serum albumin) standard (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mg/mL) を  $10 \mu\text{L}$  ずつ 96 穴プレートに入れ、BCA™ Protein Assay Reagent A 液と B 液が 50 : 1 の割合の混合液  $200 \mu\text{L}$  を加え、軽く攪拌後、37°C、30 分間静置した。マイクロプレートリーダー Model550 (Bio-Rad 社) を用いて 570nm で吸光度を測定した。測定は 3 回繰り返し、平均値から近似曲線を求めた。

## 結果と考察

GG3 水溶液と GG5 水溶液の流動曲線からゼロずり速度における比粘度 ( $\eta_{sp}$ )<sub>0</sub> を求め、 $C[\eta]$  に対して両対数プロットしたものを Fig.1 と Fig.2 に示した。ここで、 $C$  は GG の濃度で、 $[\eta]$  は固有粘度である。直線の折曲がり点は、 $C^*$  で示される。 $C^*$  より高濃度では、粘度が急激に高くなることから、溶媒中で GG 分子が重なり合いを始める濃度と考えられている<sup>15)</sup>。GG3 において、 $C^*$  より低濃度領域 ( $Y_{\text{low}}$  で示す。) は  $Y_{\text{low}}=1.7684X^{1.5084}$

( $R^2=0.9815$ )、高濃度領域 ( $Y_{high}$  で示す。) は  $Y_{high}=1.1077X^{2.5309}$  ( $R^2=0.9948$ ) の累乗回帰式でそれぞれ近似することができた。さらに、GG5において、 $C^*$  より低濃度領域は  $Y_{low}=1.5766X^{1.2312}$  ( $R^2=0.9884$ )、高濃度領域は  $Y_{high}=1.262X^{2.1102}$  ( $R^2=0.9629$ ) の累乗回帰式でそれぞれ近似することができた。GG3とGG5のゼロずり速度における粘度が  $30 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  は、この曲線より高濃度領域に属することが判明し、高濃度領域における累乗回帰式により濃度を求めることができた。その結果、GG3は  $0.3467\text{g}/100\text{mL}$ 、GG5は  $0.5348\text{g}/100\text{mL}$  となった。ゼロずり速度における粘度を  $30 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  を一定値にする場合、GG3とGG5の重量平均分子量  $M_w$  は  $20.1 \times 10^5 \text{ g/mol}$ 、と  $M_w$  は  $12.2 \times 10^5 \text{ g/mol}$  により、GG3はGG5より重量平均分子量が大きいことから、GG5より溶解する濃度は低くなることを確認した。

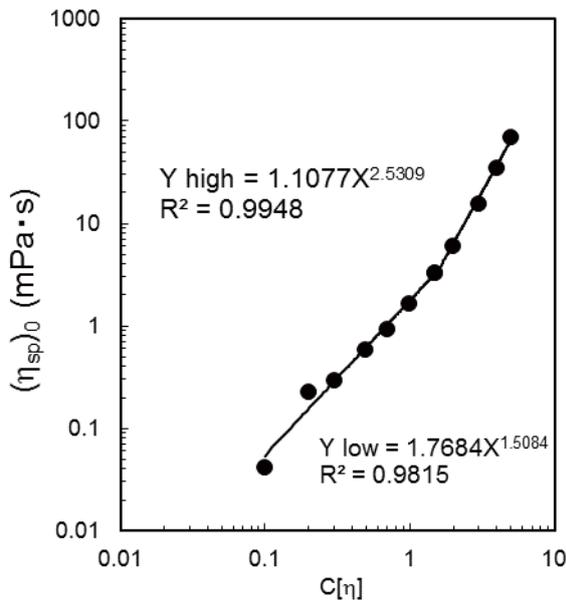


Fig.1 Generalized concentration dependence of viscosity for GG3

Fig.3はSPI単独系およびSPI・GG3混合系、SPI・GG5混合系におけるパンクレアチン添加による動的粘弾性の貯蔵弾性率  $G'$  の時間依存性を示した。SPI単独系の  $G'$  は時間とともに減少し、SPIがパンクレアチンの酵素作用によって分解されたことが推察された。特に測定開始直後(酵素添加3分後から測定開始)にはすでに減少がみられた。SPI・GG3混合系、SPI・GG5混合系では、 $30\text{mPa}\cdot\text{s}$  のGGがSPIに加わっただけに関わらず、貯蔵弾性率  $G'$  はSPI単独系に比べて顕著に高くなったことより、粘弾性発現におけるSPIとGGの相乗

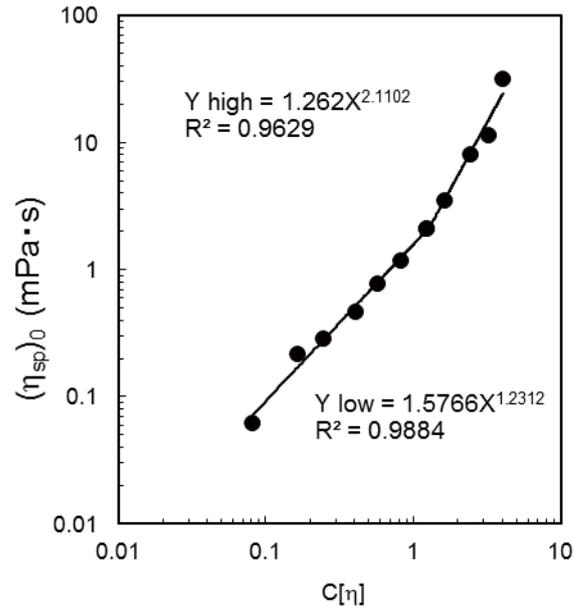


Fig.2 Generalized concentration dependence of viscosity for GG5

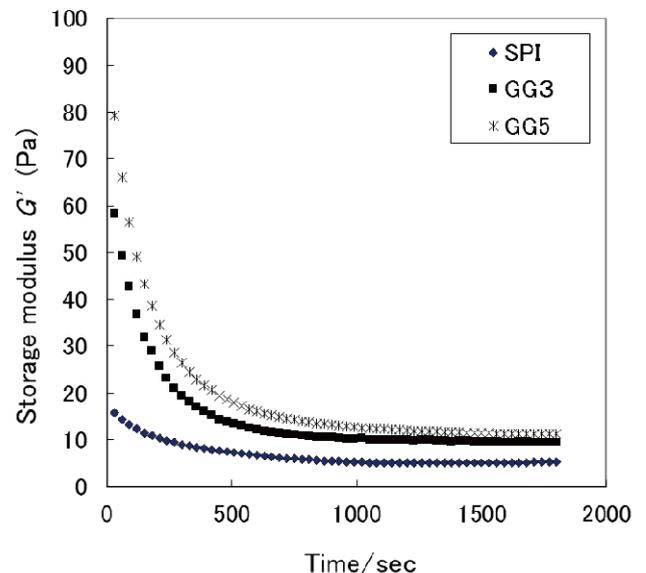


Fig.3 Time evolution of  $G'$  for dispersions of SPI, SPI・GG3, and SPI・GG5 with pancreatin.  
 SPI: Dispersion of SPI with pancreatin  
 GG3: Dispersion of SPI・GG3 with pancreatin  
 GG5: Dispersion of SPI・GG5 with pancreatin

効果が考えられた。SPI・KGM(コンニャクグルコマン)混合系でも同様のことが観察された<sup>14)</sup>。

SPI・GG混合系では、 $G'$ は時間とともに減少し、平衡値に達した。SPI・GG混合系の分解は、SPI単独系

に比べてゆっくり進んだ。SPI に食物繊維ハイドロコロイド添加することで、パンクレアチン酵素による SPI の分解が遅延する現象は、グアーガム、キシログルカン、コンニャクグルコマンナンにおいても同様のことが観察された<sup>12,13,14</sup>。SPI・GG3 と SPI・GG5 とでは、混合したもののゼロずり粘度は同じにも関わらず、SPI・GG5 の方がゆっくり進む現象がみられ、これらは GG の重量平均分子量の大きさが影響することが示唆された。

多糖類やタンパク質のゲル化過程のレオロジー的变化は 2 段階の一次反応式で取り扱われることが多く<sup>16-18</sup>、分解過程のレオロジー的变化も次式により近似できる。そこで、以下の式から分解過程を検討した。

$$G(\theta) = 1 - G'_{1s}(1 - e^{-k_1t}) - G'_{2s}(1 - e^{-k_2t}),$$

$$G_{3s} = 1 - G'_{1s} - G'_{2s}$$

$k_1, k_2$  は速度定数( $k_1 > k_2$ )であり、 $G_{3s}$  は平衡値を示す。最小二乗法を用いて、 $k_1, k_2, G_{3s}$  を求めた結果を Table 1 に示した。

速度定数  $k_1, k_2$  , 平衡値  $G_{3s}$  は、SPI 単独系と比較して、SPI・GG 混合系の速度定数  $k_1$  は小さく、平衡値  $G_{3s}$  はやや大きくなった。ゼロずり速度における比粘度が 30 mPa・s で GG を添加した場合、SPI・GG3 の  $k_1, k_2, G_{3s}$  は SPI・GG5 より高値を示した。SPI とキシログルカン混合系では、パンクレアチン酵素の作用は、粘度の影響だけでなく、その粘度を決めるキシログルカンの分子量の影響によっても影響されることが示唆された<sup>13</sup>。グアーガムにおいても重量平均分子量が影響されることが示唆された。

ゼロずり粘度が等しい SPI・GG の混合系において、グアーガムの分子量が小さく濃度の高い GG5 の方が、グアーガムの分子量が大きく濃度の低い GG3 より分解が遅く進むことが観察された。このことより、GG のゼロずり粘度が同じ場合、GG の短い鎖状分子が多く含まれる方が、分離大豆タンパクの分解は抑制されることが推察された。

Table 1 The values of  $k_1, k_2$  and  $G_{3s}$  for dispersion of SPI, SPI+GG3 and SPI+GG5 with pancreatin

	$k_1$	$k_2$	$G'_{3s}$	偏差
SPI	1.247	0.098	5	0.127
SPI+GG3	0.292	0.097	11	0.096
SPI+GG5	0.275	0.078	10	0.085

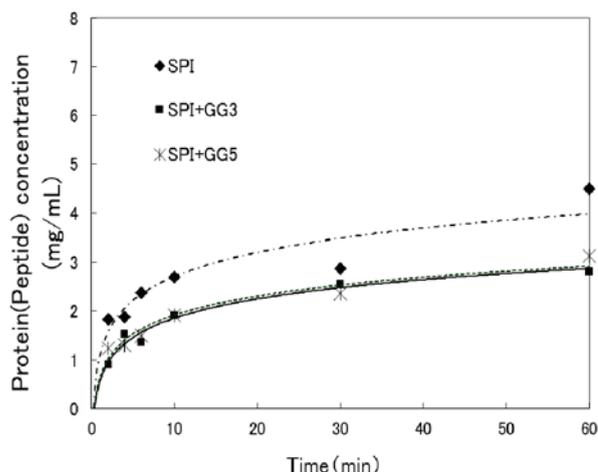


Fig.4 Time evolution of dispersion of SPI, SPI・GG3, and SPI・GG5 with pancreatin by BCA method  
 SPI: Dispersion of SPI with pancreatin  
 GG3: Dispersion of SPI・GG3 with pancreatin  
 GG5: Dispersion of SPI・GG5 with pancreatin

Fig.4 に、SPI 単独系および SPI・GG3 混合系、SPI・GG5 混合系におけるパンクレアチン添加による BCA 法によるたんぱく質濃度を示した。用いた BCA 法は、タンパク質のペプチド結合によって  $\text{Cu}^{2+}$  イオンが還元されて  $\text{Cu}^+$  となり、次に 2 分子のビシンコニン酸 (BCA) が  $\text{Cu}^+$  イオンをキレートして紫色の産物を生じる反応を利用している。試料は限外ろ過膜 (分画分子量 3 万) により処理されたろ液を用いていることから、測定しているたんぱく質は分子量 3 万以下のもの (ペプチド) であり、いずれの試料も時間とともに、たんぱく質がパンクレアチン酵素により分解され、分子量 3 万以下のたんぱく質 (ペプチド) 量が増加することが推察された。SPI 単独系は、SPI・GG3 混合系、SPI・GG5 混合系より増加割合が大きい結果を示した。SPI・GG3 混合系と SPI・GG5 混合系とでは、両者に顕著な差はみられなかったが、SPI・GG 混合系は SPI 単独系に比べて酵素によるたんぱく質の分解を抑制することが示唆された。

要約

分子量分布の異なるグアーガムを用いて、ゼロずり粘度を 30mPa・s と一定値とした場合の分離大豆たんぱく質のパンクレアチンによる分解に対するグアーガムの影響を調べることを目的とした。

- 1) GG3 水溶液と GG5 水溶液の流動曲線からゼロずり速度における比粘度 ( $\eta_{sp} / C$ ) を求め、 $C [\eta]$  に

対して両対数プロットした。ゼロずり粘度 30 mPa・s は、それぞれ高濃度領域における累乗回帰式により濃度を求めた結果、GG3 は 0.3467g/100mL、GG5 は 0.5348g/100mL となった。

2) 動的粘弾性の時間依存性より、SPI 単独系の  $G'$  は、時間とともに減少し、SPI がパンクレアチンの酵素作用によって分解することが示唆された。

SPI・GG 混合系は、SPI 単独系に比べてパンクレアチン酵素作用における速度定数  $k_1$ ,  $k_2$  が小さく、平衡値  $G_{3s}$  は大きくなり、GG 添加により酵素反応が遅延することが示唆された。ゼロずり粘度が等しい SPI・GG の混合系では、グアーガムの分子量が小さく濃度の高い GG5 の方が、グアーガムの分子量が大きく濃度の低い GG3 より分解が遅く進むことが観察された。GG のゼロずり粘度が同じ場合、GG の短い鎖状分子が多く含まれる方が、分離大豆タンパクの分解は抑制されることが推察された。

3) BCA 法により、SPI 単独系および SPI・GG3 混合系、SPI・GG5 混合系ではパンクレアチン添加により、いずれの試料も時間とともに、分子量 3 万以下のたんぱく質(ペプチド)量が増加し、たんぱく質がパンクレアチン酵素により分解されペプチドが増加することが推察された。SPI・GG 混合系は SPI 単独系に比べて、ペプチド量の増加が少ないことから酵素によるたんぱく質の分解を抑制することが示唆された。

#### 謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業(基盤 C)の支援を受けて実施した。

#### 参考文献

- 1) McCleary, B.V.: *Dietary fibre analysis, Proc.Nutr.Soc.*, 62, 3-9 (2003)
- 2) De Vries, J.W.: *On defining dietary fibre, Proc.Nutr.Soc.*, 62, 37-43 (2003)
- 3) Phillips, G.O.: *Colloids: A partnership with nature, Hydrocolloids Part2*, 3-14, edited by Nishinari,K., Elsevier Science B V. (2000)
- 4) Jenkins, D.J., Leeds, A.R., Gassull, M.A., Cochet, B. and Alberti, G.M.: *Decrease in postprandial insulin and glucose concentrations by guar and pectin, Ann. Intern. Med.*, 86, 20-23 (1977)
- 5) 渡邊篤二、斉尾恭子、橋詰和宗『大豆とその加工』, 建帛社 (1987)

- 6) 山内文男:『大豆の科学』,朝倉書店 (1992)
- 7) Kelsay, J.L.: *A review of research on effects of fiber intake on man. J.Clin.Nutr.*, 31, 142-159 (1978)
- 8) Booth, A.N., Hendrickson, A.P. and Deeds, F.: *Physiologic effects of three microbial polysaccharides on rats. , Toxic.Appl.Pharmac.* 5, 478-484 (1963)
- 9) Harmuth-Hoene, A.E. and Schwerdtfeger, E.: *Effects of indigestible polysaccharides on protein digestibility and nitrogen retention in growing rats. , Nutr. Metab.*, 23, 399-407 (1979)
- 10) Commings, J.H., Southgate, D.A.T., Branch, W.: *The colonic response to dietary fiber from carrot, cabbage, apple, bran and guar gum. , Lancet.* 1, 5-9 (1978)
- 11) Ikegami, S., Tsuchihashi, F., Harada, H., Tsuchihashi, N., Nishida, E. and Innami, S.: *Effects of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats. , J.Nutr.* 120, 353-360 (1989)
- 12) Yoshimura, M., Nishinari, K.: *Rheological studies of influence of dietary fibers on the enzymatic reaction for soy protein isolate., FFI J.*, 210(10), 954-962 (2005)
- 13) 金保叔、吉村美紀、曾根良昭、西成勝好:「分離大豆タンパク質の消化酵素分解に対するキシログルカンの影響」『大阪市大生活科学研究』6, 1-8 (2007)
- 14) 吉村美紀、船見孝博:「コンニャクグルコマンナンの粘度と分離大豆タンパク質の酵素分解に対する影響」『兵庫県大学環境人間学部研究報告』11, 83-88 (2009)
- 15) Morris, E.R.: *Polysaccharide rheology and in-mouth perception, Food Polysaccharides and Their Applications*, pp527-530, edited by Alistair, M.S., Marcel Dekker Inc. (1995)
- 16) Nishinari, K., Kohyama, K., Zhang, Y., Kitamura, K., Sugimoto, T., Saio, K., Kawamura, Y.: *Rheological study on the effect of the A5 subunit on the gelation characteristics of soybean proteins. Agric. Biol.Chem...* 55, 351-355 (1991)
- 17) Yoshimura, M. and Nishinari, K.: *Dynamic viscoelastic study on the Gelation of konjac glucomannan with different molecular weighs, Food Hydrocoll.*, 13, 227-233 (1999)
- 18) 吉村美紀、柴田文江、江藤正義、西成勝好:「大豆粉水分散液の GDL によるゲル化過程のレオロジー」『日食科工誌』51, 3, 115-122 (2004)

(平成 26 年 9 月 25 日受付)