

平成30年6月28日現在

機関番号：34513

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350110

研究課題名(和文) 新しい食料資源としてのエゴマタンパク質の利用に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Studies aimed at effective use of perilla proteins as a new food material

研究代表者

竹中 康之 (TAKENAKA, Yasuyuki)

神戸松蔭女子学院大学・人間科学部・教授

研究者番号：20273518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：未利用の食品資源であるエゴマタンパク質の有効利用を目指し、エゴマタンパク質の乳化活性を測定した。植物タンパク質として広く食品工業に用いられる分離大豆タンパク質と比較して、エゴマタンパク質は2.9倍も強い乳化活性を示した。溶解度の違いをもとに、アルブミン画分、低分子グロブリン画分、高分子グロブリン画分に分け、それぞれの乳化活性を測定したところ、低分子グロブリン画分が最も強い乳化活性を示した。低分子グロブリン画分の主要タンパク質は、分子量約12000の単量体であり、分子量約6000の2つのサブユニットがジスルフィド結合していると推測できた。

研究成果の概要(英文)：In order to effectively utilize perilla proteins, an unused food resource, we measured their emulsifying activity. Perilla proteins had 2.9-times higher emulsifying activity than soy protein isolates (SPI), which are a widely used plant protein in the food industry. Perilla proteins were divided based on differences in solubility into albumin, low-molecular-weight globulin, and high-molecular-weight globulin fractions, and the emulsifying activity of each fraction was measured. As a result, the low-molecular-weight globulin fraction was found to have the strongest emulsifying activity. The main protein of the low-molecular-weight globulin fraction was a monomer of approximately 12,000 kDa, and this molecule may be composed of 2 disulfide-bonded subunits of approximately 6,000 kDa.

研究分野：食品機能学

キーワード：エゴマタンパク質 乳化性

1. 研究開始当初の背景

日本でのエゴマ *Perilla (Perilla frutescens var. frutescens)* の利用は古く、縄文時代の遺跡からも種子が見つかり、食用にしていたと推測され、現在もエゴマの伝統料理は全国に残っている。エゴマ種子を圧搾して得られるエゴマ油は、脂質を約 43% 含み、その構成脂肪酸として α -リノレン酸を約 60% 含むため、健康機能が期待できる食用油脂として脚光を浴び、需要が年々増加している。一方、エゴマ種子はタンパク質含量が約 18% と高く、アミノ酸スコアは 92 であり、植物タンパク質の中では良質なタンパク質と言える。にもかかわらず、食品素材としての利用法に関する研究がなされていないため、エゴマ脱脂粕は主に肥料や飼料として利用されるのみである。

我々は、エゴマタンパク質が約 11% のアルブミン、約 84% のグロブリンから構成されること、グロブリンは約 1/3 が低分子グロブリン、約 2/3 が高分子グロブリンに大別されることを見出した。さらに、この最も多量に含まれる高分子グロブリンは、分子量 34 万の単一タンパク質で大豆グリシニンと類似したサブユニット構造を有すること、保水性に優れた加熱誘導ゲルを形成すること、このゲル形成にはジスルフィド結合の寄与が大きいことを明らかにしている。

2. 研究の目的

エゴマタンパク質の食品素材への利用を目指す場合、乳化性は重要な性質である。そこで、本研究ではエゴマタンパク質の乳化活性を評価するとともに、乳化活性に寄与するタンパク質を解析した。

3. 研究の方法

(1) エゴマタンパク質の調製

エゴマ種子を n-ヘキサンで脱脂した。脱脂種子からタンパク質を 10% NaCl 溶液により抽出した。遠心分離後、抽出液を蒸留水に対して透析後、凍結乾燥した。

(2) 分離大豆タンパク質の調製

ダイズ種子を n-ヘキサンで脱脂した。脱脂ダイズを蒸留水 (pH 9) で抽出し、抽出液を pH 4.5 に調整してダイズタンパク質を等電点沈殿させた。得られた沈殿を凍結乾燥した。

(3) エゴマタンパク質の分画

エゴマタンパク質を蒸留水で抽出し、上清をアルブミン画分とした。さらに、蒸留水、1.5% NaCl 溶液、10% NaCl 溶液で順に抽出し、それぞれアルブミン画分、低分子グロブリン画分、高分子グロブリン画分を得たのち、凍結乾燥した。なお、低分子グロブリン画分、高分子グロブリン画分は蒸留水に対して透析後、凍結乾燥した。また、タンパク定量を

行い、各画分のタンパク質の含量を測定した。

(4) 乳化性の解析

試料をタンパク質濃度が 0.1% (w/v) となるようにリン酸緩衝液 (pH 8) に溶解した。この溶液 6 ml を水相、コーン油 2 ml を油相とし、ホモジナイザーを使用して 24000 rpm で 1 分間ホモジナイズしてエマルションを調製した。エマルションの水相の底部から 50 μ L とり、0.1% SDS 溶液で 100 倍希釈した溶液の吸光度 (500 nm) を測定した。乳化活性は、以下の式に従って求めた。

$$EAI (m^2/g) = 2T (A \times \text{dilution factor} / C \times \Phi \times 10,000)$$

$T = 2.303$; $A = 500\text{nm}$ の吸光度; dilution factor = 100, $C =$ 水相のタンパク質濃度; $\Phi = 0.25$

(5) ゲルろ過クロマトグラフィー

低分子グロブリンを Sephacryl S-100HR column (16 mm \times 60 cm) を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行なった。

(6) アミノ酸分析

低分子グロブリンを 6N HCl (110°C, 24 時間) により加水分解し、定法に従ってアミノ酸分析を行なった。

4. 研究成果

分離大豆タンパク質 (SPI) は、アミノ酸スコアが 100 の良質なタンパク質であるとともに、保水性、ゲル化性、乳化性などの様々な機能を有するため、食品工業に広く用いられる。興味深いことに、エゴマタンパク質は SPI の 2.9 倍の乳化活性を示した (図 1)。

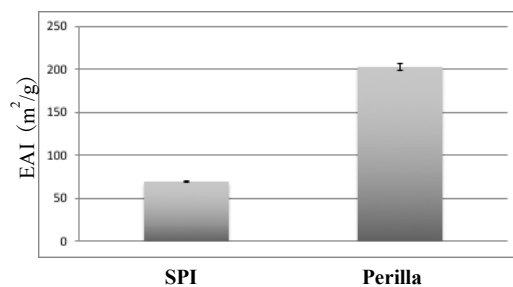


図 1 分離大豆タンパク質とエゴマタンパク質の乳化活性

エゴマ種子中のタンパク質は 95% がアルブミンもしくはグロブリンであり、主要タンパク質はアルブミン (水可溶性) 画分、低分子グロブリン画分 (1.5% NaCl 抽出)、高分子グロブリン画分 (1.5~10% NaCl 抽出) と溶解性により容易に分画できる。エゴマ脱脂粕 5g から得た各画分に含まれるタンパク質量は、アルブミン画分 0.22 g、低分子グロブリン画分 1.11 g、高分子グロブリン 2.35 g であった。そこで、各画分の乳化活性を測定し

たところ、低分子グロブリン画分が最も高く、次いで高分子グロブリン画分、アルブミン画分、の順となった（図2）。

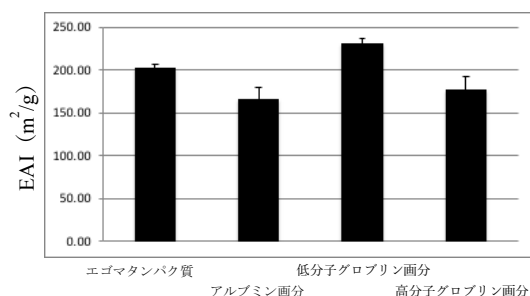


図2 エゴマタンパク質の各画分の乳化活性

各画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE（還元剤なし）により分析した。低分子グロブリン画分は主要成分として分子量 12000 のバンドが確認された。アルブミン画分も低分子グロブリンと同様、主に低分子のタンパク質からなり、分子量約 11000 と 12000 の2本の主要なバンドが確認された（図3 lanes 2 and 3）。アルブミン画分と低分子グロブリン画分に見られる分子量約 12000 のバンドは、溶解性の違いから異なるタンパク質と想定しているが、更なる検討が必要である。

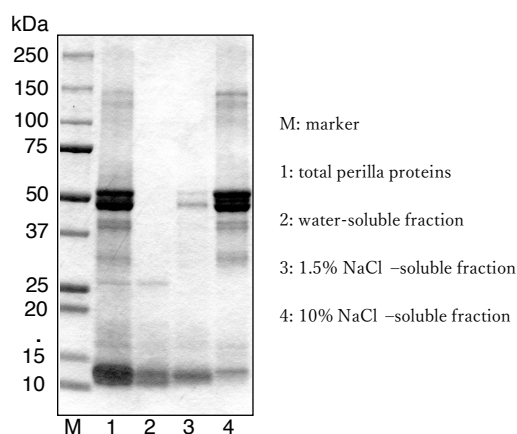


図3 エゴマタンパク質の各画分の SDS-PAGE

低分子グロブリンをゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した（図4）。

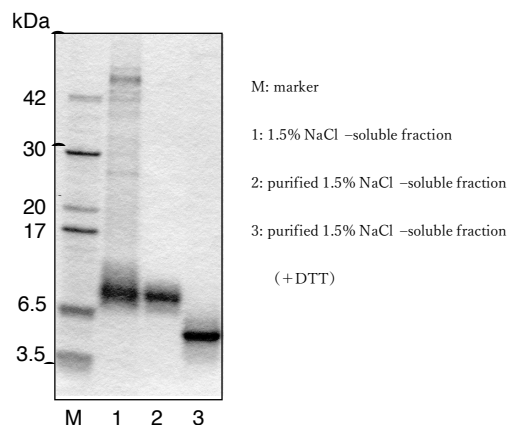


図4 精製した低分子グロブリンの SDS-PAGE

ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出容量から、低分子グロブリンは分子量が約 12000 と推定され、SDS-PAGE（還元剤なし）の推定分子量と一致するため、低分子グロブリンは単量体であると推測された。さらに、低分子グロブリンを還元剤存在下で SDS-PAGE に供すると、分子量約 6000 の1本のバンドが確認された。したがって、低分子グロブリンは分子量約 6000 の2本のサブユニットがジスルフィド結合している単量体として存在していると予想された。

次に、低分子グロブリン画分のアミノ酸分析を行った（表1）。

（表1）低分子グロブリンのアミノ酸組成

Asx	244
Thr	101
Ser	231
Glx	1308
Pro	163
Gly	201
Ala	162
Cysine	231
Val	134
Met	130
Ile	116
Leu	254
Tyr	222
Phe	170
Lys	149
His	104
Arg	692
Trp	23

(mg / 1 g of nitrogen)

アミノ酸評点パターン（1～2歳、2007年 WHO/FAO/UNU）と比較すると、含硫アミノ酸、芳香族アミノ酸以外は制限アミノ酸であり、第一制限アミノ酸はトリプトファン、アミノ酸スコアは49であった。

本研究では、エゴマタンパク質が分離ダイズタンパク質よりも優れた乳化活性を持つことを明らかにし、新たな食品素材としての可能性を示した。また、乳化活性の寄与が最も大きい低分子グロブリンのサブユニット構造を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 1 件）

竹中康之 エゴマ種子低分子グロブリンの構造と栄養・加工特性（第71回 日本栄養・食糧学会大会）2017年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 康之 (TAKENAKA, Yauyuki)

神戸松蔭女子学院大学・人間科学部・教授

研究者番号：20273518