

テウチグルミから分離した蛋白質の 乳化特性について(第2報)

—テウチグルミから分離した蛋白質溶液の
乳化容量におよぼす加熱処理の影響—

古内幸雄

Studies on the Emulsifying Properties of Isolated Proteins from Walnut (Part II)

—Effect of Heating on Emulsifying Capacity

of Isolated Walnut Protein Solution—

Yukio FURUUCHI

Nagano-ken Junior College, 49-7, Miwa 8-chome Nagano 380, Japan

ABSTRACT Effects of heat treatment and addition of salts on emulsifying capacity of acid precipitated protein (APP), N-ethylmaleimide rized acid precipitated protein (NEM-APP), ethanol precipitated protein (EPP) and acetone precipitated protein (AcPP), all isolated from the walnut, *Juglans regia*, were studied. Results obtained were: (1) Emulsifying capacity of APP and NEM-APP slightly decreased, but those of EPP and AcPP were hardly affected by heating the protein solution; (2) by heating these proteins solution containing 0.01 N sodium chloride at 80°C for 10min, emulsifying capacity of APP and NEM-APP increased exceedingly, but those of EPP and AcPP decreased; (3) by the addition of sodium sulfate, emulsifying capacity of these proteins showed the same tendency as those of ones containing sodium chloride in case of heating as well as no heating; and (4) SDS polyacrylamide gel electrophoretic patterns of APP were scarcely changed by heat treatment or addition of salt (NaCl or Na₂SO₄), but those of other proteins were changed remarkably.

[*Journal of Nagano-ken Junior College, No. 37, pp. 5-9-1982.*]

前報¹⁾においては、テウチグルミ(*Juglans regia* L.) から分離した酸沈殿蛋白質、エタノール沈殿蛋白質およびアセトン沈殿蛋白質の三種について、その溶解性に及ぼすpHの影響と、乳化容量に及ぼす要因としてpH、食塩、蛋白質濃度をとりあげ検討し報告した。

本報では上記三種の分離蛋白質と、新にNEM (N-Ethylmaleimide) 化酸沈殿蛋白質を加え、これら四種の分離蛋白質溶液を加熱処理した時の乳化容量に及ぼす影響を検討し又、食塩及び硫酸ナトリウムの塩類を添加した蛋白質溶液についても同様に加熱処理しその影響を検討した。加熱処理及び塩類の添加による分離蛋白質の蛋白質組成の変化については、SDS ポリアクリルアミド電

気泳動を行なって比較検討した。

実験方法

1, 実験材料

分離蛋白質の調製に用いたクルミは前回¹⁾と同様、長野県東部町で収穫されたテウチグルミを使用した。ここで得られた酸沈殿蛋白質、NEM 化酸沈殿蛋白質、エタノール沈殿蛋白質、アセトン沈殿蛋白質は、以下、それぞれ、APP, NEM-APP, EPP, AcPP と記すこととする。

2, 分離蛋白質の調製法

APP, EPP, AcPP の調製法は前回¹⁾と同様に行なった。NEM-APP の調製は次の方法によった。脱脂ク

ルミ粉から10% NaCl(pH7.0)で抽出した液に12ミリモルの NEM を30分間作用させた後、1N-HCl で pH を 4.0 に調整した時沈殿してくる区分を透析後、真空凍結乾燥し NEM-APP とした。NEM 化は、蛋白質の遊離 SH 基や、unfold して蛋白分子表面に出現した SH 基をブロックするために行われるものである。

3, 分離蛋白質の蛋白質含量と水分含量

今回使用した分離蛋白質の蛋白質含量と水分含量は次のとおりであった。

	蛋白質(%)	水分(%)
APP	87.45	8.08
NEM-APP	88.62	8.30
EPP	56.87	8.65
AcPP	52.05	10.48

なお蛋白質の定量は、常法のセミ・マイクロケルダール法で行ない、窒素-蛋白質換算係数は5.3を使用した。

4, 乳化容量 (Emulsifying Capacity, 以下, E. C と記す) の測定

前回¹⁾と同様、電気抵抗法によって測定した。乳化容量の測定に供した分離蛋白質溶液は水又は塩類溶液で0.5%濃度に調整し、O/W 型から W/O 型に転相した時の油の容量 (ml) を、分離蛋白質の N 1mg あたりに換算した値をもって乳化容量とした。

油は、味の素 K. K 製のサラダオイルを使用した。

5, 分離蛋白質溶液の加熱処理

0.5%濃度に調整した蛋白質溶液は、所定の温度で10分間加熱した後、急冷した。

塩類を含む蛋白質溶液の調製は、予め所定の濃度に調整した塩溶液で行ない、その後上記と同様の加熱処理を行なった。塩類として NaCl (半井化学薬品工業 K K 製, 試薬特級) および Na₂SO₄ (和光純薬工業 K K 製, 試薬特級) を使用し、塩類の濃度は、0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, および1.0N とした。

蛋白質溶液の pH はすべて7.0とした。

6, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

分離蛋白質の加熱処理及び塩類添加による蛋白質組成の変化を検討するため、常法²⁾の SDS 電気泳動 (以下 SDS-PAGE) を行なった。SDS-PAGE 用試料は、次のようにして調製した。乳化容量に供した試料と同様の処理を行なった後、4,000r.p.m で10分間遠心して得られた沈殿物を1% SDS-8M 尿素溶液で溶解し SDS-PAGE に供した。なお、クルミ分離蛋白質は、水および塩溶液に難溶であることから上澄みについては SDS-

PAGE は行なわなかった。

実験結果

1, 乳化容量におよぼす蛋白質溶液加熱処理の影響
柴崎・大久保³⁾は、大豆の水抽出液、酸沈殿蛋白質の乳化能が加熱によって著しく増加することを報告し、青木・長野⁴⁾は、乳化容量におよぼす加熱処理の効果がほとんど認められなかったことを報告している。このように実験者によって異なった結果が出ることについて、青木・長野⁴⁾は、乳化特性の測定条件に依存する固有の部分が多分に含まれているためと考察している。このような意味でも、又、大豆蛋白質とクルミ蛋白質の構成蛋白質の種類が全く異なるという点からも、比較検討の対象としてとりあげることは妥当性を欠くが、一応の傾向を知る上で有意義と考えられる。

Fig. 1 に、分離蛋白質溶液の加熱処理温度と、E. C の関係を示した。APP, NEM-APP は加熱処理による E. C への影響はほとんど認められなかったが、EPP は 30°C で、AcPP は 50°C まで E. C. の低下がみられ、以

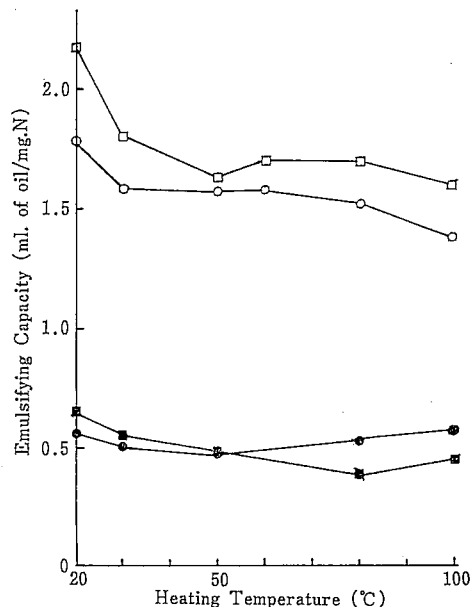


Fig. 1 Effect of Heating on Emulsifying Capacity of isolated protein from walnut
●—●: Acid precipitated protein, 76.00mg.N%
■—■: NEM rized acid precipitated protein, 76.67mg.N%
○—○: Ethanol precipitated protein, 49.00mg.N%
□—□: Acetone precipitated protein, 43.96mg.N%
pH 7.0

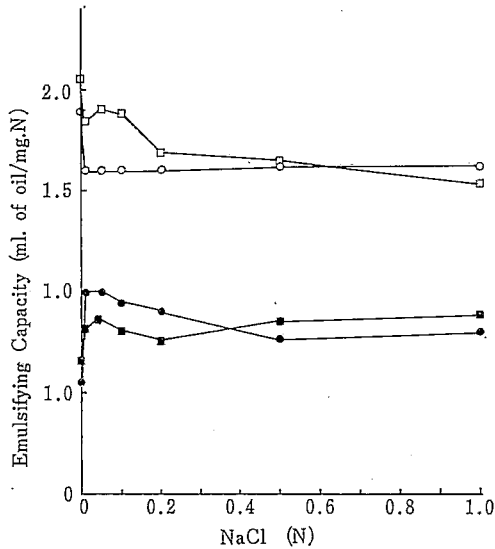


Fig. 2 Effect of NaCl concentration on Emulsifying Capacity of isolated proteins from walnut, when heated

The symbols are the same as those in Fig. 1.

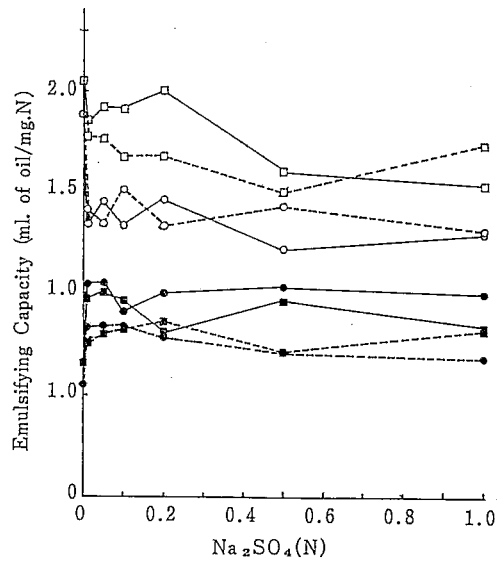


Fig. 3 Effect of Na_2SO_4 concentration on Emulsifying Capacity of isolated proteins from walnut

—: unheated, ---: heated

The symbols are the same as those in Fig. 1.

後80°Cまではそれ程大きな変化はなかったが100°Cで再び低下した。

2. 塩類を含む蛋白質溶液の加熱処理による乳化容量への影響

前報¹⁾においては、食塩の添加による分離蛋白質の乳化容量におよぼす影響が、EPPにおいて大きく、APPおよびAcPPでは小さいことを報告した。しかし、食塩を含む蛋白溶液を加熱処理した場合は、Fig. 2に示したように、食塩濃度0.01Nで、APP、NEM-APPのE.C.は著しく上昇し、以後漸減し、0.5Nでは一定となった。EPP、AcPPでは0.01Nで低下し、EPPでは以後一定となり、AcPPは、0.2Nまで徐々に低下した後E.C.は一定した。

食塩濃度0.05Nをこえると、加熱、無加熱いずれの場合も、蛋白質溶液のE.C.におよぼす効果は小さいことが認められた。

Na_2SO_4 の分離蛋白質溶液のE.C.におよぼす影響は、NaClの場合とほぼ同じ傾向がみられ (Fig. 3)、加熱処理の有無にかかわらず、APP、NEM-APPでは、0.01NでE.C.は著しく上昇し、0.05Nでは一定値を示した。一方、EPP、AcPPは、0.01NでE.C.は低下し、0.2Nまで増減をくり返したのち、0.5N以降再び低下する傾向がみられた。

いずれの分離蛋白質についても、全体的に無加熱の方が、加熱処理をしたものよりもE.C.は高い値を示した。

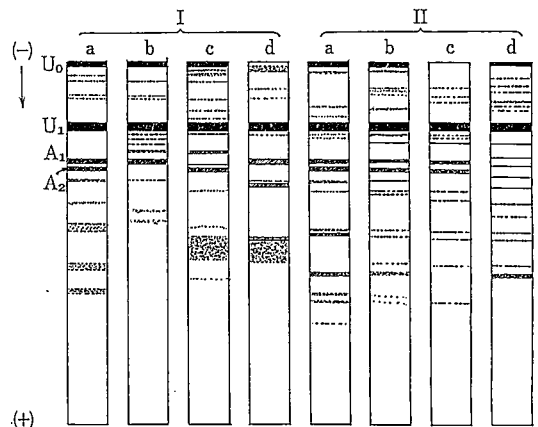


Fig. 4 SDS polyacrylamide disc electrophoretic patterns of isolated proteins from walnut

I : unheated

II : heated at 80°C

a : Acid precipitated protein

b : NEM rized acid precipitated protein

c : Ethanol precipitated protein

d : Acetone precipitated protein

3. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による蛋白質組成の検討

既報⁵⁾の通り、クルミ分離蛋白質は、溶けにくい蛋白質のため、溶解性のよい SDS-PAGE で検討した。Fig. 4に、分離蛋白質溶液を80°Cで10分間処理した場合の

泳動パターンを示した。対照として無加熱の泳動パターンをあわせて示した。

無加熱の分離蛋白質では、いずれも易動度の小さい2本の濃いバンド(U₀, U₁)、および2本の主成分(A₁, A₂)を含めて、10数成分のバンドが認められた。このU₀, U₁は、既報⁵⁾において、S-S結合で重合体を形成している成分であることを確認した。

APP, NEM-APPでは、加熱処理をしても、泳動パターンにほとんど変化は認められなかったが、EPPでは、U₀のバンドが消失し、A₁, A₂がより濃いバンドとなってあらわれ、加熱によって低分子化することが認められた。このU₀は、2-メルカプトエタノール処理に

よっても消失し、新にA₂より小さい分子量の成分がバンドとなってあらわれることが確認されている⁵⁾が、EPPの加熱処理では、そのようなバンドは認められなかった。AcPPでは、EPPとは逆に加熱処理によってA₁のバンドが消失しかわって、U₀が強くあらわれた。

Fig. 5は、食塩水で、Fig. 6は硫酸ナトリウム溶液でそれぞれ蛋白溶液を調製し、20分間放置したのち遠心分離して得られた沈殿物を SDS-PAGE に供した時の泳動パターンである。Fig 5 に示したように、APP の泳動パターンは、食塩濃度0.01, 0.50Nいずれの場合も、Fig. 4の無加熱の場合のパターンとほとんど変化は認められなかった。しかし、NEM-APP では、いずれの食塩濃度でも、U₀のバンドが消失し、代わってU'₀のバンドがみられたことから、いく分、低分子化したことが推察された。EPPにおいても、NEM-APPと同様、U₀のバンドが消え、易動度の大きいバンドが、新に認められ、低分子化が激しいと考えられた。0.01N NaClで処理したAcPPの泳動パターンは、Fig. 4のIのパターンとほとんど変化はみられなかったが、0.50Nでは、U₀のバンドが消失した。

Na₂SO₄ 溶液で処理した場合の分離蛋白質の泳動パターンは、Fig. 6 に示したように、App では、Na₂SO₄ 濃度0.01, 0.50Nいずれの場合も、変化はみられなかった。

NEM-APP においては、0.01, 0.50N いずれの場合も、U₀ が消失し、易動度の大きい低分子成分が増加する傾向がみられ、遊離のSH基をブロックするというNEMの影響によるものと思われる。EPP, AcPPについても、Na₂SO₄ 処理によって泳動パターンに変化がみられ、前者では、0.01NでU₀が、0.50NでA₂のバンドが消失した。後者では同様に0.01Nで、U₀が消え、新たに、U₁とA₁の間に2本の濃いバンドが認められた。0.50Nにおいては、U₀は消失しなかったが、A₁のバンド及び、A₂より易動度の大きいバンドの2本が消失した。

これらのことから、APP 以外の分離蛋白質は、加熱処理、塩類の添加により、かなり蛋白組成に変化が生じることが、認められた。しかし、このことが、乳化容量を含めた乳化特性と、どのような関連を持つのかは、明確にすることはできなかった。

要約

テウチグルミ (*Juglans regia* L.) から分離した酸沈殿蛋白質(APP), NEM化酸沈殿蛋白質(NEM-APP) エタノール沈殿蛋白質 (EPP) およびアセトン沈殿蛋白質 (AcPP) の乳化容量 (E.C) におよぼす蛋白溶液の

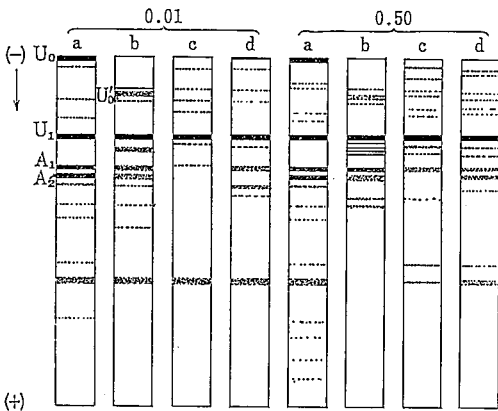


Fig. 5 SDS polyacrylamide disc electrophoretic patterns of isolated proteins added NaCl
0.01 : NaCl concentration, 0.01N
0.50 : NaCl concentration, 0.50N
The small letters are the same as those in Fig.4.

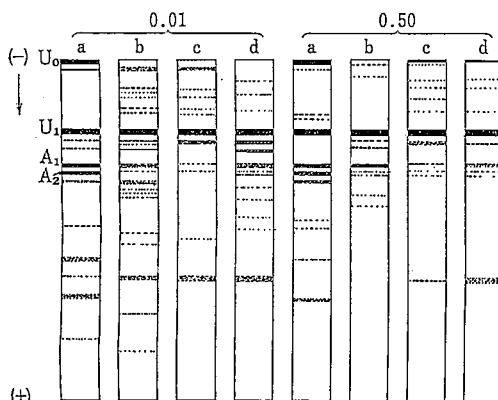


Fig. 6 SDS polyacrylamide disc electrophoretic patterns of isolated proteins added Na₂SO₄
0.01 : Na₂SO₄ concentration, 0.01N
0.50 : Na₂SO₄ concentration, 0.50N
The small letters are the same as those in Fig.4.

テウチグルミから分離した蛋白質の乳化特性について (第2報)

加熱処理の影響を検討し、又、加熱処理および塩類 (NaCl, Na_2SO_4) の添加によって蛋白質組成にどのような変化をおよぼすかを SDS-PAGE によって検討した。

(1) APP, NEM-APP の乳化容量は、蛋白質溶液の加熱処理によって、ほとんど影響をうけなかったが、EPP のそれは、 30°C で大きく低下し、以後ほぼ一定となり、 100°C で再び低下した。APP では、 50°C まで低下をつづけ以後ほぼ一定となった。

(2) 食塩を添加した蛋白質溶液の加熱処理によって、APP, NEM-APP の E.C は、食塩濃度 0.01, 0.05N で急上昇し、それ以上の食塩濃度では徐々に低下し、0.50N でほぼ一定となった。

EPP, AcPP では、0.01N-NaCl で、E.C は大きく低下し、以後ほぼ一定値を示した。

(3) Na_2SO_4 を添加した蛋白質溶液の E.C は、無加熱、加熱いずれの条件下でも、NaCl を添加した場合と、ほぼ同じ傾向がみられ、又、全体的に無加熱の方

が、加熱処理をした場合より、高い E.C 値を示した。

(4) 加熱処理した蛋白質溶液および、塩類 (NaCl, Na_2SO_4) を添加した蛋白質溶液の SDS-PAGE の泳動パターンから、APP の蛋白質組成は、加熱処理および塩類の添加によってほとんど影響が認められなかったが、他の分離蛋白質では、かなり蛋白質組成に変化がみられた。

終りに、一部実験の手伝いをいただいた本学助手、牛越静子氏に感謝します。

文 献

- 1) 古内幸雄:長野県短期大学紀要, 36(1981).
- 2) 林健志, 大場義樹:蛋白質・核酸・酵素, 17, 304(1972).
- 3) 柴崎一雄・大久保一良・佐藤隆夫:食品工誌, 19, 580(1972).
- 4) 青木宏・長野宏子:食品工誌, 22, 320(1975).
- 5) 古内幸雄・浅野三夫・柴崎一雄:食品工誌, 28, 548(1981).