
研究報文

グアーミール水抽出画分に含まれる起泡性タンパク質

下山 亜美*, 土居 幸雄

Foaming Proteins Contained in Guar Meal Extracts

Ami Shimoyama*, Yukio Doi

We recently showed that the water extract of guar meal, a byproduct produced during extraction of guar gum, contains an albumin fraction having both high foaming activity and foam stability, named guar foaming albumin (GFA). Here, we examined the water extract remnant obtained after precipitating GFA, which still possessed considerable foaming activity and foam stability. By cation exchange chromatography the remnant was separated into two fractions with high foaming activity and stability; a protein fraction and non-proteinous fraction, probably saponin. The former fraction contained basic proteins with 20–40 kDa characterized by high content of Glu, Gly, Thr, Ala and Lys. The basic proteins as well as GFA were mainly found in germ, not in hull or endosperm, of guar beans.

(Received September 16, 2009)

はじめに

豆科植物のグアー豆 (*Cyamopsis tetragonolobus*) は、主にインド北西部、パキスタン東部などで野菜として消費されたり、家畜の餌として利用されている。グアー豆胚乳部から工業的にグアーガム (ガラクトマンナン) が精製され、ソフトクリーム の硬化剤、チーズやホイップクリーム の安定剤、また肉の結合剤として使用されている。このグアーガムの精製の際に、豆の約 30% に相当するグアーミール (種皮・胚芽部) が廃棄されている。しかし、グアーミールには約 45% のタンパク質が存在しており、その性質についてはいくつかの報告がある¹⁻⁴⁾。食塩水溶液 (1 M) で抽出した画分には見かけの分子量 1 kDa ~ 250 kDa を示す複数のタンパク質が含まれており、起泡性を持つ²⁾。この画分の起泡性の pH による影響を見ると、pH 2 で、大豆タンパク質よりも 1.3 倍高い起泡性を示した。Khalil らは⁵⁾、グアー豆を 0.1 M NaOH と 1 M NaCl 混合溶液で抽出した時、抽出効率

が一番良く、リシン含量の高いタンパク質が回収されると報告している。我々は、これまでの研究で、グアーミールのタンパク質の性質を大豆タンパク質と比較し⁶⁾、水抽出画分に高い起泡性と泡沫安定性を示すアルブミンが存在することを示した⁷⁾。水抽出画分から等電点沈殿により得たアルブミンを、グアー起泡性タンパク質 (GFA: guar foaming albumin) と命名し、その性質を調べたところ、見かけの分子量 6 kDa と 11 kDa のサブユニットがジスルフィド結合した、比較的 low molecular weight のタンパク質が主成分であり、GFA は高い起泡性と泡沫安定性をあわせ持つタンパク質であった。また、GFA は比較的高いアミノ酸価をもち、小麦アレルギー患者の抗血清に対しても交差反応を示さず、起泡性を利用する加工食品において、卵白代替タンパク質として利用出来ることが示唆された。

GFA の解析を進める中で、グアーミールの水抽出画分には、酸沈殿で GFA を除去した後の画分にも、高い起泡性を認めた。このため、本研究では、グアーミールの水抽出画分に含まれる起泡性タンパク質成分についてさらに調べることにした。

* 大阪薫英女子短期大学生生活科学科
京都女子大学大学院家政学研究科

実験方法

1. 試料

パキスタン産のグアー豆（乾燥）およびグアーガムの材料として胚乳部を分離して用いた後の廃棄物であるグアーミール（種皮部、加熱処理済の粉末状）は株式会社第一化成（京都市山科区）よりいただいた。グアーミールは、ブレンダー（Waring Products Division, Torrington, CT, U.S.A）で4～5分粉碎した。その粉碎試料を電子天秤で200g秤り、ヘキサン（和光純薬株式会社）を用い、朝日奈式抽出器（500ml）を使用して、十分に脱脂・脱臭ができるまで連続して抽出を行った。脱脂後の試料は、ガラス製のシャーレに移しガーゼで覆い、ドラフト内に入れてヘキサンを蒸発させた。得られた脱脂・脱臭試料は、シリカゲルの入ったタッパーに入れて、低温室で保存した。これを脱脂試料とした。

2. タンパク質の抽出

脱脂試料10gに対し、50倍量（500ml）の水を加え膨潤させた後、ブレンダーを用い、3分間粉碎した。その後、さらに1Lの水を加え、マグネチックスターラーを使用し、低温室で一晩抽出を行った後、4℃、8,000rpm、25分間遠心分離を行った。得られた上清液を水抽出画分とした。この水抽出画分を、4M HClでpH4.0に調整した後、1時間放置した。その後、同様に遠心分離を行い、上清液を非酸沈殿画分として分離した。得られた沈殿画分は、少量の10mM Tris-HCl (pH7.8)を加え、1M NaOHでpH6.5～7.0に調整した後、低温室で一晩放置後、遠心分離で不溶性残渣を除去して得られた上清液を酸沈殿画分とした。この画分がGFAである。

3. タンパク質の定量

Bradfordらの方法に従い⁸⁾、市販のプロテインスタンダードⅡ 牛血清アルブミン（Bio-Rad社）をスタンダードとした。精製水で5倍希釈したプロテインアッセイ染色液（Bio-Rad社, Bio-Rad Protein Assay）を用い、595nmでの吸光度の測定から求めた。試料中のタンパク質の定量は3回の平均値で表した。

4. 起泡性および泡沫安定性の評価

起泡性の評価は前報に従って行った⁷⁾。つまり、試料溶液（1ml）を目盛り付試験管に入れサーモミキサーで90秒間激しく攪拌し、直後の泡の体積を測定した。泡沫安定性の評価は、30分放置後の泡の体積で見積もった。起泡性および安定性評価のために使用した全ての試料の調製には、10mM Tris-HCl, pH7.8を用い、タンパク質濃度は0.5mg/mlとした。

比較のために用いた卵白は、水様性卵白を使用した。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli⁹⁾らの方法に従い、15%アクリルアミドゲルを使用し、1mmスラブ泳動板を用いて、SDS-電気泳動を行った。

6. アミノ酸分析

抽出した各タンパク質画分を水で十分に透析した。各試料（約10μg）をサンプルチューブにとり、ウォーターズ PICO・TAG™ ワークステーション（日本ウォーターズ株式会社）で、6N 塩酸を用い、106℃、24時間の気相加水分解を行った。トリエチルアミンを加え、塩酸を除去した後、試料を乾固し、0.02N 塩酸を200μl用い溶解した。不純物をろ過して除去し、ろ液10μlを日立アミノ酸分析計、L-8500型にかけて分析した。和光純薬アミノ酸混合標準液 H 型を標準物質として用い、各アミノ酸の定量を行った。

7. イオン交換クロマトグラフィー

CM-トヨパールイオン交換体（Carboxymethyl-Toyopearl 650S, 東ソー株式会社）を充填した5×4.5cm カラムを使用し、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。緩衝液は、20mM ギ酸アンモニウム (pH4.0)を用い、NaCl 濃度勾配 (0～0.4M)を用いて溶出した。流速は300ml/hr, 分画容量は20ml/本とした。

Super Q-トヨパールイオン交換体（SuperQ-Toyopearl 650M, 東ソー株式会社）を充填した5×4.5cm カラムを使用し、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。緩衝液は、10mM Tris-HCl (pH7.8)を用い、NaCl 濃度勾配 (0.05～0.4M)を用いて溶出した。流速は300ml/hr, 分画容量は10ml/本とした。

結果および考察

1. グアーミール水抽出画分の起泡性と泡沫安定性

脱脂グアーミールの水抽出画分は、同タンパク質濃度の卵白溶液と比較したとき、明らかに高い起泡性と泡沫安定性を示した（図1）。水抽出画分をpH4に調整し、酸沈殿画分と非酸沈殿画分に分けた場合、両画分とも卵白のみならず、水抽出画分よりも優れた起泡性と安定性を示した。酸沈殿画分の起泡性と泡沫安定性は、GFAによるものであり、その性質の一部はすでに報告している⁷⁾。非酸沈殿画分における泡沫は、GFAにより生じた泡に比べると、粗く、泡のサイズが全体的に大きい特徴が見られた。泡沫安定性を、30分後のタンパク質あたりの泡

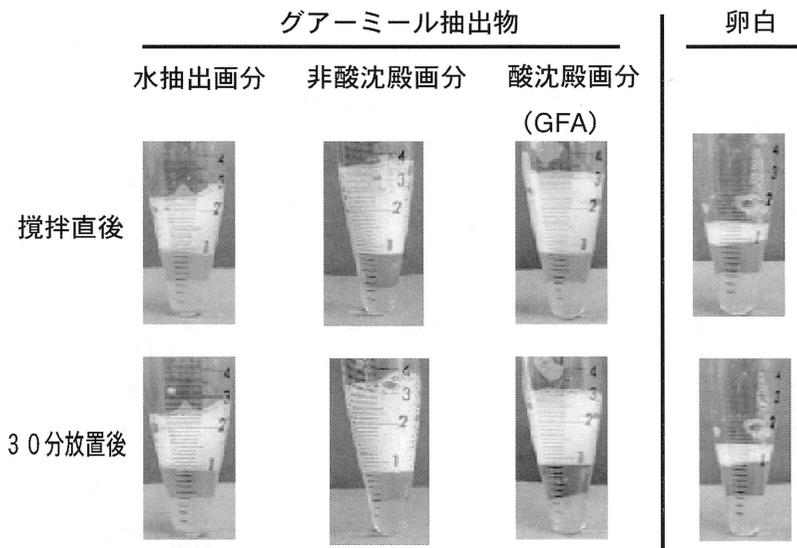


図 1 各グアー豆抽出画分と卵白の起泡性および泡沫安定性の比較

水抽出画分，酸沈殿画分 (GFA)，非酸沈殿画分の各試料 (タンパク質濃度0.5mg/ml) 1 ml をサーモミキサーで90秒間攪拌を行った直後の泡の様子 (起泡性) と30分放置後の泡 (泡沫安定性) を示す。

表 1 各抽出画分の泡沫安定性の精製結果*1

	上清液 (ml)	タンパク質濃度 (mg/ml)	タンパク質量 (mg)	タンパク質回収率 (%)	タンパク質量あたりの泡沫安定性*2 (ml/mg)	総泡沫安定性*3	泡沫安定性回収率
水抽出画分	1,460	1.4	2,044	100	10	20,440	100
酸沈殿画分	55	3.3	182	9	19	3,458	17
SupQ 画分-a	225	0.4	90	4	18	1,620	8
非酸沈殿画分	1,430	0.4	572	42	44	25,168	123
CM 画分-a	750	0.1	75	4	61	4,575	22
CM 画分-b	630	0.13	82	4	17	1,394	7

*1 グアーミール10gを使用した場合の結果

*2 タンパク質あたりの泡沫安定性：30分放置後の泡の容量 (ml)/タンパク質濃度 (mg/ml)

*3 総泡沫安定性：泡沫安定性 (mg) × タンパク質量 (mg)

沫量で評価した時，非酸沈殿画分の総泡沫安定性は，水抽出画分のそれを上回っていた (表 1)。これは，泡沫安定性をタンパク質量あたりで定義したことにより，非酸沈殿画分の泡沫安定性を過大評価しているためかも知れない。この場合は，タンパク質以外の物質が起泡性と安定性に関わっている可能性を示唆している。非酸沈殿画分には，GFA と同様に起泡性を持つタンパク質が存在していないのだろうか。この点を明らかにするために，非酸沈殿画分のイオン交換クロマトグラフィーを行った。

2. 陽イオン交換クロマトグラフィーによる非酸沈殿画分の精製

非酸沈殿画分を CM-トヨパールイオンイオン交

換クロマトグラフィーで分離した結果を図 2 に示す。起泡活性は，素通り画分 (ピーク a) と 0.1~0.3M 食塩濃度で溶出した吸着画分 (ピーク b) の両方に見られた。タンパク質濃度は，ピーク a, b 両画分ではほとんど変わらなかったが，ピーク a 画分の泡沫安定性は，ピーク b 画分の 3 倍であった (表 1)。SDS 電気泳動の結果，ピーク a 画分にはタンパク質染色で染色されるものが見られず，ピーク b には分子量 20kDa~40kDa の数種のタンパク質が含まれていた。また，ピーク b に含まれるタンパク質の示す泡沫安定性は，タンパク質量あたりの値で比較すると，GFA とほぼ同等であるといえる (表 1)。これらのタンパク質は陽イオン交換体に吸着されてお

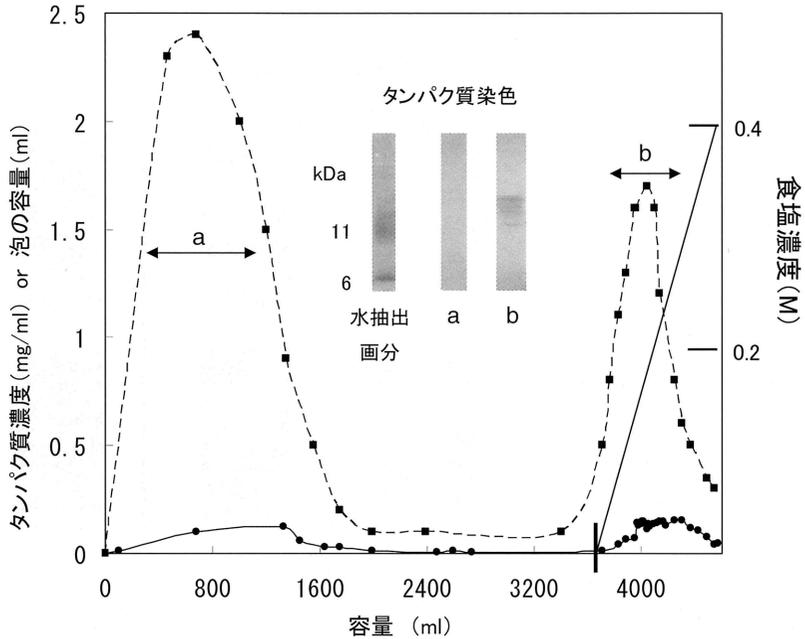


図2 陽イオン交換クロマトグラフィーによる非酸沈殿画分の溶出パターン

非酸沈殿画分 (143mg タンパク質/1300ml) を CM-Toyopearl650S カラム (5×4.5cm) にかけた。タンパク質の溶出パターン (●) と、起泡性 (■) を示した。ピーク a と b を回収し、還元剤存在下で 20% ポリアクリルアミドゲルを使用し、SDS 電気泳動を行った後、タンパク質染色を行った。

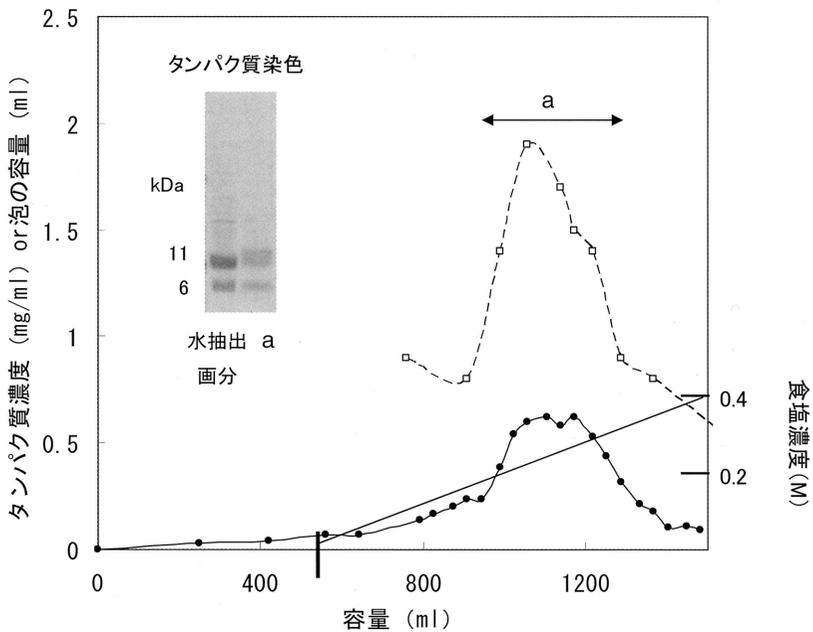


図3 陰イオン交換クロマトグラフィーによる酸沈殿画分の溶出パターン

等電点沈殿で得られた酸沈殿画分 (154mg タンパク質/28ml) を SuperQ-Toyopearl 650M カラム (5×4.5cm) にかけた。タンパク質の溶出パターン (●) と、起泡性 (□) を示した。ピーク a を回収し、還元剤存在下で 20% ポリアクリルアミドゲルを使用し、SDS 電気泳動を行った後、タンパク質染色を行った。

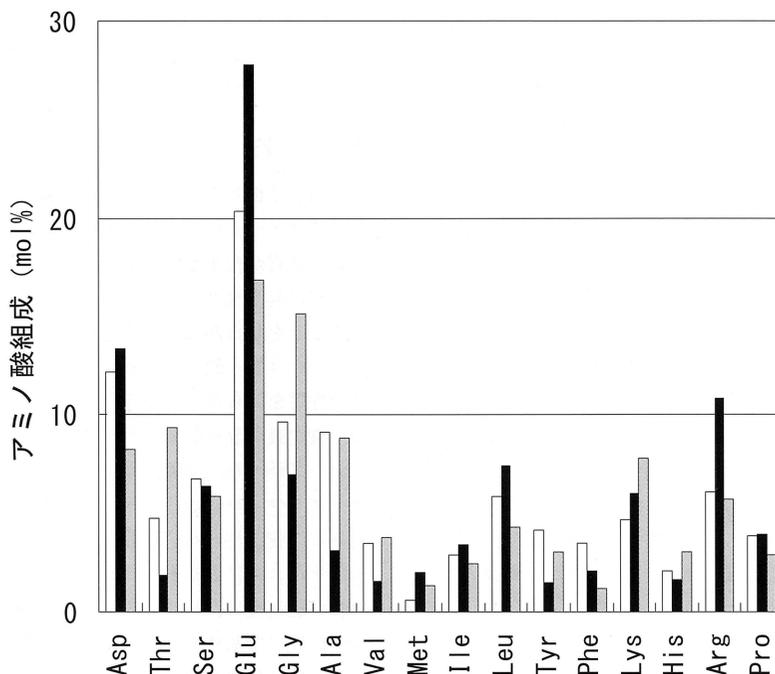


図 4 グアー豆の水抽出画分, Super Q 画分および CM 画分のタンパク質のアミノ酸組成

グアーミール各抽出物のアミノ酸組成を mol% で示した。それぞれ水抽出画分 (□), Super Q 画分 (図 3 ピーク a) (■), CM 画分 (図 2 ピーク b) (▒) を示す。

り, その等電点は塩基性領域に存在すると考えられる。GFA は pH 4 で沈殿するために, 酸性領域での起泡剤としての使用はできないかもしれないが, これらのタンパク質は酸性の食品で起泡剤として有用かもしれない。

グアーミールには, 多量のサポニン (100mg/g) が含まれていることが報告されている¹⁰⁾。サポニンは使用した緩衝液の pH で正電荷を帯びていないことはなく, 現在のクロマトグラフィーの実施条件下では, 樹脂に吸着せず素通りすると考えられる。このため, ピーク a 画分の起泡性と泡沫安定性の大部分はサポニンによると考えられる。ただ, タンパク質もわずかながら含まれており, 現時点ではそれによる可能性を否定することは出来ない。多くのサポニンは配糖体として存在する。非酸沈殿画分の比較的高い糖濃度 (0.18mg/ml)⁷⁾ は, ピーク a 画分の起泡性がサポニンによるものであることを支持しているが, 最終的な結論には, 今後更なる分析が必要である。

3. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる酸沈殿画分の精製

酸沈殿画分 (GFA) について Super Q-トヨパールイオン交換クロマトグラフィーにかけた結果を図 3 に示す。GFA は, 還元剤を含まない SDS 電気泳動

では 1 本 (13kDa) のバンド, 還元剤を含む SDS 電気泳動では, 2 本 (6kDa と 11kDa) のバンドを示すことから, 主に 6kDa と 11kDa の 2 つのサブユニットがジスルフィド結合したタンパク質より構成されることが結論された⁷⁾。図 3 でタンパク質は比較的広い食塩濃度範囲 (0.1~0.3M) で溶出しており, GFA には等電点の異なる複数のタンパク質が含まれていることが示唆される。ただし, いずれのタンパク質も SDS-電気泳動の結果は, 比較的低分子 (6kDa と 11kDa) のタンパク質よりなることを示している。GFA についても, 今後詳細なタンパク質の化学的解析が必要である。

4. 各抽出画分のアミノ酸組成

水抽出画分, 非酸沈殿画分を CM クロマトグラフィーで精製したタンパク質画分 (CM 画分 b; 図 2 ピーク b) および, 酸沈殿画分を Super Q クロマトグラフィーで精製した画分 (Super Q 画分; 図 3 ピーク a) の各アミノ酸組成をモル% で図 4 に示して, 比較した。水抽出画分のアミノ酸組成は, 全般に見ると CM 画分 b と Super Q 画分の平均値に近く, Asp, Glu, Gly や Ala 含量が多くなっている。Super Q 画分は Glu Asp や Arg が多く, 酸沈殿画分である GFA のアミノ酸組成⁷⁾ に類似していた。CM

画分 b には Glu, Gly, Thr, Ala や Lys が多く、非酸沈殿画分⁷⁾と類似していたが、Thr, Ala, His 含量は大きく異なっていた。

一般的に肉や魚などの動物性タンパク質と比較すると、米や小麦などに含まれる植物性タンパク質はアミノ酸スコアが低く、リジンや含硫アミノ酸が不足しがちである。アミノ酸分析の結果から、Super Q 画分は第一制限アミノ酸が Val で、アミノ酸スコアは37、CM 画分 b は、Leu で、アミノ酸スコアは68であった。小麦タンパク質のグルテンは、アミノ酸スコアが31であり、これと比較するとグアーミール抽出の方が、栄養価が高いことが示された。

5. グアー豆中のタンパク質分布

今回タンパク質の抽出に用いたグアーミールは、グアー豆の胚乳部に含まれるグアーガムを除去したあとの残渣であり、主にグアー豆の種皮、胚芽部からなる。GFA や非酸沈殿画分で同定した起泡性タンパク質が、グアー豆のどの部分に存在しているかを調べるために、豆（乾燥）を種皮、胚芽、胚乳部に分けて、それぞれを水で抽出後、SDS 電気泳動で分析した（図5）。種皮には、50kDa~100kDa の少なくとも3本のバンドが見られ、胚乳部にはほとんどタンパク質が含まれていない。胚芽部には広い範囲にわたる分子量を示すタンパク質が含まれてお

り、非酸沈殿画分の起泡性タンパク質(20kDa~40kDa)とGFA(6kDaと11kDa)は、主に胚芽部に存在していることが判明した。

要 約

増粘性多糖のグアーガムの精製過程において廃棄されるグアーミール（種皮・胚芽部）には、多量のタンパク質が含まれている。これまでに、水抽出画分に高い起泡性と泡安定性を示すタンパク質が存在することを明らかにし、等電点沈殿により得たアルブミンをグアー起泡性アルブミン（GFA）と命名し、その性質を明らかにしてきた。今回は、水抽出画分から酸沈殿画分を除去した非酸沈殿画分の起泡成分について調べた。非酸沈殿画分を陽イオン交換クロマトグラフィーにかけたところ、素通り画分と吸着画分に泡安定性の高い画分が見られた。前者の起泡性はサポニンによるものである可能性が示された。後者の起泡性は、見かけの分子量20kDa~40kDaを示す数種の塩基性タンパク質によるものと思われた。アミノ酸分析の結果、非酸沈殿画分には Glu, Gly, Thr, Ala や Lys が多く存在することが明らかになった。これらのタンパク質は主にグアー豆の胚芽部に分布していた。

引用文献

- 1) J.P. Nath, N. Subramanian, and M.S. Narasinga : *J. Agric.Food Chem.* , **26**, 1243 (1978)
- 2) J.P. Nath, N. Subramanian, and M.S. Narasinga : *J. Agric.Food Chem.* , **28**, 844 (1980)
- 3) J.P. Nath, N. Subramanian, and M.S. Narasinga : *J. Agric.Food Chem.* , **29**, 529 (1981)
- 4) J.P. Nath, M.S. Narasinga : *J. Food Sci.* , **46**, 1255 (1981)
- 5) M.M. Khalil : *Nahrung/Food.* , **45**, 21 (2001)
- 6) 下山亜美, 竹重智子, 田中有紀, 吉岡里恵, 木戸詔子 : 京都女子大学食物学会誌, **58**, 1 (2003)
- 7) A.Shimoyama, S. Kido, Y.Kinekawa, and Y. Doi : *J. Agric.Food Chem.* , **56**, 9200 (2008)
- 8) M.M. Bradford : *Anal.Biochem.* , **72**, 248 (1976)
- 9) U.K. Laemmli : *Nature*, **277**, 680 (1970)
- 10) D.E.Fenwick, D. Oakenfull : *J.Sci. Food Agric.* , **34**, 186 (1983)

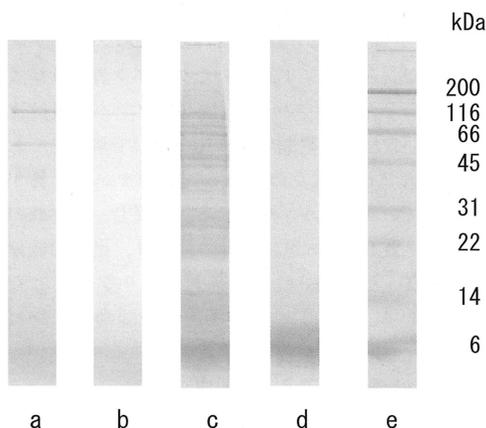


図5 グアー豆の種皮、胚芽、胚乳の SDS-電気泳動パターン

グアー豆を種皮部、胚芽部、胚乳部に分け粉砕後、それぞれを水で抽出した。還元剤存在下で15%ポリアクリルアミドゲルを使用し、SDS-電気泳動を行った後、タンパク質染色を行った。種皮(a)、胚乳(b)、胚芽(c)、水抽出画分(d)、および分子量マーカー(e)を示す。右側の数値はマーカーの分子量(kDa)を示す。