

電気泳動法による大豆タンパク質の分析

誌名	香川県発酵食品試験場報告
ISSN	03685640
著者	木村, 功
巻/号	81号
掲載ページ	p. 23-24
発行年月	1989年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



電気泳動法による大豆タンパク質の分析

木 村 功

緒 言

大豆タンパク質を加工する際、過度の加熱は、タンパク質のサブユニット内における共有結合の解裂や生成を引き起こし、酵素による分解度を低下させることが報告されている¹⁾。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(以下SDS-PAGEと略す)法は、タンパク質の分子量やサブユニット構造の分析に有効な手法である²⁾。そこでSDS-PAGE法を用い加熱処理した大豆タンパク質のサブユニット構造を解析すると共に、タンパク分解酵素による分解度を検討したので報告する。

実験材料及び方法

大豆タンパク質は和光純薬株式会社製を用いた。タンパク分解酵素は当試験場保存菌 *Aspergillus oryzae* 103 を用いて調整した。

1) 大豆タンパク溶液の調製

大豆製タンパク粉末 0.5 g を 100 ml 50 mM トリス-塩酸緩衝液 pH 8.0 (0.1 M 塩化ナトリウムを含む) に溶解し、遠心分離 (10,000 xg, 30 min) によって得た上澄液を大豆タンパク溶液とした。

2) タンパク分解酵素の調製

菊池らの方法³⁾に従って調製した麴 30 g に 100 ml 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 (0.1 M 塩化ナトリウムを含む) を添加し、4℃にて一昼夜振とう抽出を行った。これを4層のガーゼで濾過後、遠心分離 (10,000 xg, 30 min) し、得られた上澄液を 25 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 に対して透析を行い、大豆タンパク分解酵素とした。

3) 大豆タンパク溶液の加熱及び酵素処理

2)の方法にて調製した大豆タンパク溶液は各温度条件 (60, 80, 100, 110 及び 121℃) にて30分間加熱し、SDS-PAGE 並びに酵素処理に供した。酵素処理は大豆タンパク溶液 5 ml (タンパク量で15 mg) を含む 10 ml 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 にタンパク分解酵素 0.5 ml (タンパク量で250

μg) を添加し、40℃にてインキュベートした。経時的にBradford法⁴⁾にて、反応液中の未分解タンパク量を測定した。また、酵素処理10分後の大豆タンパク質をSDS-PAGEによって分析した。

4) SDS-PAGE 法及びタンパク染色

SDS-PAGEはLaemmliらの方法⁵⁾にて行った。また、Oakleyらの方法⁶⁾に基づいてタンパク染色を行った。

5) タンパク質の定量

タンパク質はBradford法によって牛血清アルブミンをスタンダードとして定量した。

結果及び考察

加熱処理を行った大豆タンパク質のSDS-PAGEの結果を図1に示した。未処理の大豆タンパク質は、グリシニン、β-コングリシニン及び塩基性7Sグロブリンに相当するサブユニットの明瞭なバンドを形成した(図1.レーンG)。加熱温度

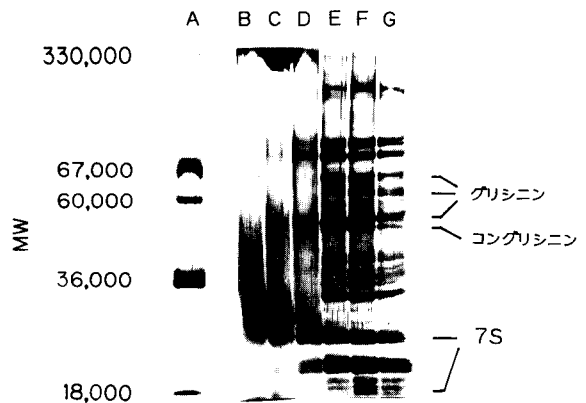


図1 加熱処理した大豆タンパク質のSDS-PAGEによる分離

A: 分子量マーカー チログロブリン(330,000), アルブミン(67,000), カタラーゼ(60,000), 乳酸デヒドロゲナーゼ(36,000), フェリチン(18,000)
B-G: 各温度(B)121℃, (C)110℃, (D)100℃, (E)80℃, (F)60℃, (G)室温にて30分間加熱
タンパク溶液に等量の10% TCAを添加、沈澱したタンパク質は SDS 処理後 SDS-PAGE にて分析した。

の上昇に伴いバンドは徐々に認められなくなり、レーンBにおいては低分子域を中心とした幅広いスポットとなった。

加熱処理した大豆タンパク質を基質とし、タンパク分解酵素による分解率を検討した。その結果、分解率は加熱処理温度に伴って増加したが、121℃にて処理したタンパク質は110℃での処理に比べ低い分解率を示した。これは従来報告されているサブユニット分子内での共有結合の解裂、及び生成²⁾に起因すると考えられる。また、未処理のタンパク質における20%近い分解率は、調製時に何等かの変性を受けているためと考えられた。

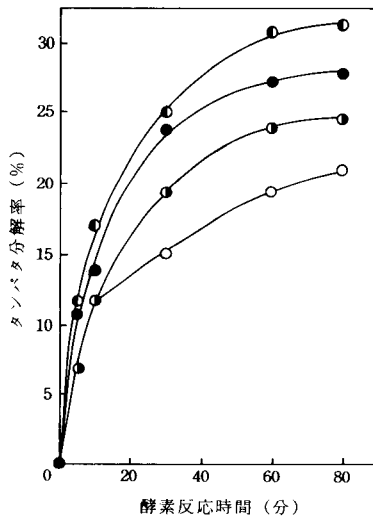


図2 加熱処理の異なる大豆タンパク質の酵素分解性の比較

基質の変性条件：大豆タンパク質を各温度(○)室温、(◐)80℃、(◑)110℃、(●)121℃にて30分間加熱
 酵素分解条件：麹菌粗酵素液を用いpH7.0、40℃にて分解

タンパク分解率は各時間における未分解タンパク量を基に算出した。

タンパク分解率： $(1 - (b/a)) \times 100$

a：酵素反応開始0分のタンパク量

b：酵素反応開始以降、経時的に採集した際のタンパク量

図3に酵素処理10分後の大豆タンパク質をSDS-PAGEにて分析した結果を示した。いずれのレーン(B, C, D, E, F, G)においてもグリニン、 β -コングリニン等のサブユニットは認められず、タンパク分解酵素に由来する無数のバンドが認められた。これはタンパク分解酵素によって大豆タンパク質のサブユニットが分解され、低分子化したことを示唆する。

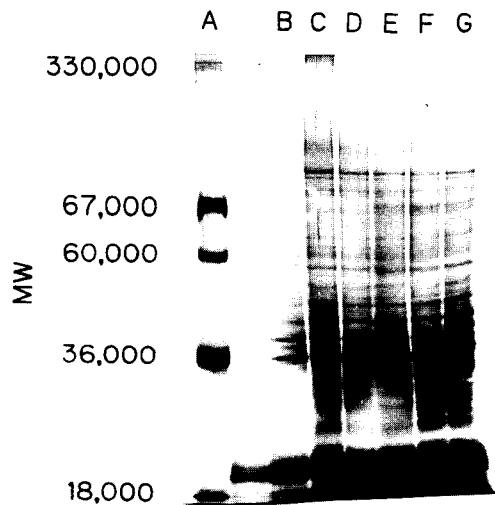


図3 酵素処理した大豆タンパク質のSDS-PAGEによる分離

A：分子量マーカー チログロブリン(330,000), アルブミン(67,000), カタラーゼ(60,000), 乳酸デヒドロゲナーゼ(36,000), フェリチン(18,000)

B-G：酵素反応10分後の溶液に等量の10%TCAを添加、沈澱したタンパク質はSDS処理後SDS-PAGEにて分析した。

要 約

SDS-PAGEによって、加熱処理した大豆タンパク質のサブユニットを分析した。また、大豆タンパク質は110℃、30分間の加熱条件によって酵素による分解度が最大となった。

文 献

- 1) 並木満夫, 林建樹：化学と生物 **21**, 368(1983)
- 2) 堀尾武一, 山下仁平：蛋白質, 酵素の基礎実験法 南江堂, p 269(1981)
- 3) 菊池忠昭, 石井茂孝, 福島男児, 横塚保：農化, **50**, 273(1976)
- 4) M.M.Bradford：Anal. Biochem. **72**, 248(1976)
- 5) U.K.Laemmli and M.Farre：J.Mol.Biol. **80**, 575(1973)
- 6) B.R.Oakley, D.R.Kirsch and N.R.Morris：Anal.Biochem. **105**, 361(1980)