

緑豆に関する食品化学的研究(1)

誌名	明治大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Meiji University
ISSN	04656083
著者名	津坂,伸幸 河原崎,靖 谷口,宏吉
発行元	明治大学農学部
巻/号	67号
掲載ページ	p. 51-67
発行年月	1984年12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



緑豆に関する食品化学的研究

〔I〕 緑豆タンパク質の分離、精製

津坂伸幸・河原崎靖・谷口宏吉

(昭和59年11月15日受理)

Food Chemical Studies on Mung Bean (*Vigna radiata*)

〔I〕 Isolation and Purification of Mung Bean Protein

Nobuyuki TSUSAKA・Yasushi KAWARAZAKI・Kōkichi TANIGUCHI

Summary

Mung bean contains 23~24% of protein. These proteins have minimal solubility between about pH 4.0~5.0, whereas they have maximal solubility at pH 1.0~3.0 on the acid side and above pH 7.0 on the alkaline side.

About 93% of the protein in defatted mung bean meal was extracted in 0.4 M NaCl-phosphate buffer at pH 7.0. Protein was consisted into different M. W. component, so-called 5 S, 11 S and 15 S fraction based on their sedimentation coefficients.

11 S fraction accounts for about 80% of the total protein. Gelfiltration of the extracts results in four different fraction in contrast to the 3 obtained by ultracentrifugation.

11 S fraction was purified by salting out, gelfiltration and ionexchange chromatography and its homogeneity was judged from polyacrylamide gel electrophoresis and ultracentrifugation.

緒

言

緑豆は主に東南アジア、中東地域に産し煮食あるいは加工用原料として消費され、わが国では“豆もやし”、“緑豆はるさめ”の原料として知られている。豆類は一般的にタンパク質の含量も多く、近年食糧資源とくに植物タンパク質の有効利用の観点から大豆タンパク質など新しい食品素材の開発を目的とした研究が数多くなされている。

緑豆に関する研究は“豆もやし”すなわち緑豆発芽体についてのものが多く、緑豆の、貯蔵タンパク質を体系的に分離、分画した研究はなされていない。また、“緑豆はるさめ”も主原料は緑豆澱粉であり、製品のタンパク質含量は0.5%以下にすぎないため、原料でんぷんを製造する際に約23%含まれているタンパク質は有効に利用されないまま廃棄され、澱粉製造工場におけ

る廃水の悪臭の原因となっている。

緑豆タンパク質を加工食品の素材として利用する試みもあるが⁴⁻⁶⁾、著者らはまず緑豆タンパク質の諸性質を明らかにすることを目的として研究を行った。

本報告では食品タンパク質の機能性に関する基礎的な諸性質についての知見を得るために緑豆タンパク質の主要成分の分離、精製を行ったものである。

試料および実験方法

試料

緑豆は台湾で生産されたものを用い、実験に供するまで5°C暗所で保存した。また、一般成分を比較するために中国産、ビルマ産のものも用いた。

実験方法

粗タンパク量は住友化学 K. K, NC-80 型 NC コーダーを使用し、グルタミン酸を標準として総窒素量を求め算出した、他の成分については A. O. A. C⁷⁾ 法に準拠して行った。

抽出液および精製の過程におけるタンパク質の定量は結晶牛血清アルブミン (Sigma, grade IV) を標準物質とし、Lowry⁸⁾ の方法、Bradford⁹⁾ の方法 (CBB-G 色素結合法)、紫外吸収測定法¹⁰⁾を用いた。

緑豆タンパク質の抽出条件

緑豆タンパク質を 10 mesh 程度に粉碎し、過剰の n-ヘキサンを数回交換しながら暗所に静置し、一週間低温脱脂したものを脱脂緑豆ミールとした。

抽出条件の検討は食塩濃度、pH、抽出時間、溶媒量比などについて行い食塩濃度については 0.4 M, 0.8 M, 1.2 M NaCl とし、pH については pH 1.0~pH 10.0 の範囲を 1.0 間隔でいずれも 1% NaOH 溶液と 1% HCl 溶液で調節した。各条件で抽出後、10,000 r.p.m, 10°C, 10分間の遠心分離を行いその上澄液の窒素量、乾燥重量を求めた。

緑豆タンパク質の成分分析

1. 超遠心分析

タンパク質抽出液をミリポアフィルター PSAC で限外濾過し、タンパク質濃度を 15 mg/ml 程度に濃縮し試料とした。分析には日立 HU-1 型分析用超遠心機を使用し、51,200 r.p.m, 20°C で行った。

2. ゲル濾過

恒温ジャケット付カラムにセルロファイブ GC-700 m (チッソ K. K.) を充填した。カラムは内径 16 mm で長さが 100 cm と 70 cm のものを直列に接続し、155 cm のゲルベッドを用いた。平衡化、溶出液には標準緩衝液(0.4-NaCl, 0.02 M-2-メルカプトエタノールを含む 35 mM 磷酸緩衝液, pH 7.5) を使用し、流速 19.0 ml/hr, カラム温度は 10°C とした。試料はタンパク質として約 65 mg を充填した。溶出液の紫外吸収を連続的に検出しながら 9.5 ml ずつ分取した。溶出液は透析により脱塩し、凍結乾燥物とした。

3. ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動 (PAGE)

Davis¹¹⁾ と Ornstein¹²⁾ の方法により行い、また緑豆タンパク質の分離に最適な条件を求めるためいくつかの変法¹³⁻¹⁶⁾ についても検討した。

凍結乾燥物を試料ゲル用緩衝液に直接溶解し、十分に攪拌したのち不溶物を 4,000 r.p.m., 室温, 5 分間の遠心分離で除去したものを試料とした。泳動開始後、マーカバンドが分離ゲルに達するまでカラム 1 本あたり 2 mA, 以後、終了までカラム 1 本あたり 4 mA の定電流で行った。染色には 0.1% CBB-G (クーマシーブリリアントブルー) の 3.5% PCA 溶液¹⁷⁾ に泳動後のゲルを直接浸漬し、室温に 24 時間静置したのち現われたバンドを観察した。デンストメータをもちいる記録のための染色は 0.25% CBB-R¹⁸⁾ の Me-OH : Ac-OH : 水 (5 : 1 : 5) 混合液に 3 時間浸漬し、同混合液で十分に自然脱色を行ったゲルを用いた。

緑豆タンパク質主要成分の精製

1. 塩析

緑豆タンパク質の主要成分を効率的に濃縮し、低分子物質、有色物質の除去を目的とし、Green らの方法¹⁹⁾ を用いて塩析を行った。結晶硫酸を直接抽出液に添加して所定の飽和度とした。飽和度は 10, 20, 35, 50, 65, 75, 90, 100% としそれぞれの上澄区分と沈澱区分の収量と窒素量を測定した。また分別効果をゲル濾過法, PAGE により検討した。

塩析は pH 7.0 になるよう 0.1 N NaOH, 0.1 N HCl でそれぞれ調節し、室温、暗所に 20 時間静置して行った。塩析後沈澱を 5,000 r.p.m., 10°C, 10 分間の遠心分離によって分離し、上澄液と沈澱画分をそれぞれ 72 時間、水透析を行った。

2. 冷沈法 (CIF 法)

脱脂緑豆ミール : 水, 1 : 10, 室温, 5 時間静置で緑豆タンパク質を抽出し、10,000 r.p.m., 10°C, 10 分遠心分離を行ない抽出液を得た。抽出液を 2°C に冷却し、48 時間静置した。生じた沈澱を 5,000 r.p.m., 0°C, 10 分間遠心分離を行い沈澱物を集め、少量の標準緩衝液に溶解して 72 時間、水透析を行った。透析後、凍結乾燥物とし、収量と窒素量を測定し、ゲル濾過法, PAGE で分別効果を検討した。

3. ゲル濾過法 (再クロマトグラフィー)

成分分析にもちいたゲル濾過法とまったく同じ条件で主要成分の再クロマトグラフィーを行った。第1回のゲル濾過で得られる主要成分の溶出画分を限外濾過(ミリポア, PSAC)により3~4 mlに濃縮する。これを再クロマトグラフィーの試料とし、全く同じ条件でゲル濾過を行い溶出される主要画分を集め、72時間水透析を行い凍結乾燥物とし、精製の程度を同様の方法で検討した。

4. イオン交換クロマトグラフィー

精製の最終的な方法としてイオン交換クロマトグラフィーを行った。

φ 2.0×20 cm ガラスカラムに DEAE-セルロファイン(AH)を充填し、10°C、流速 1.7 ml/min を定流速として 6.8 ml ずつ分取した。カラムはあらかじめ洗浄用緩衝液 200 ml をもって洗浄、次いで溶出用緩衝液 200 ml により平衡化を行い、試料 10 mg を 2 ml の溶出用緩衝液に溶解し添加した。溶出に用いた塩濃度リニアグラディエントは NaCl の濃度差で作成し、溶出液は紫外吸収測定により分取した。

洗浄用緩衝液: 2.0 M NaCl, 0.01 M 2-メルカプトエノールを含む 0.02 M Tris-HCl 緩衝液 pH 6.8

溶出用緩衝液: 0.1 M NaCl, 0.01 M 2-メルカプトエノールを含む 0.02 M Tris-HCl 緩衝液 pH 6.8

最終溶出液: 1.0 M NaCl, 0.01 M 2-メルカプトエノールを含む 0.02 M Tris-HCl 緩衝液 pH 6.8

溶出された画分は72時間、水透析を行い、凍結乾燥標品とし、収量、窒素量、PAGE、超遠心分析を行った。

結果および考察

1. 一般成分分析

15検体を測定し平均値を表1に示した。いずれの試料もでんぷんを主要成分とし、タンパク質

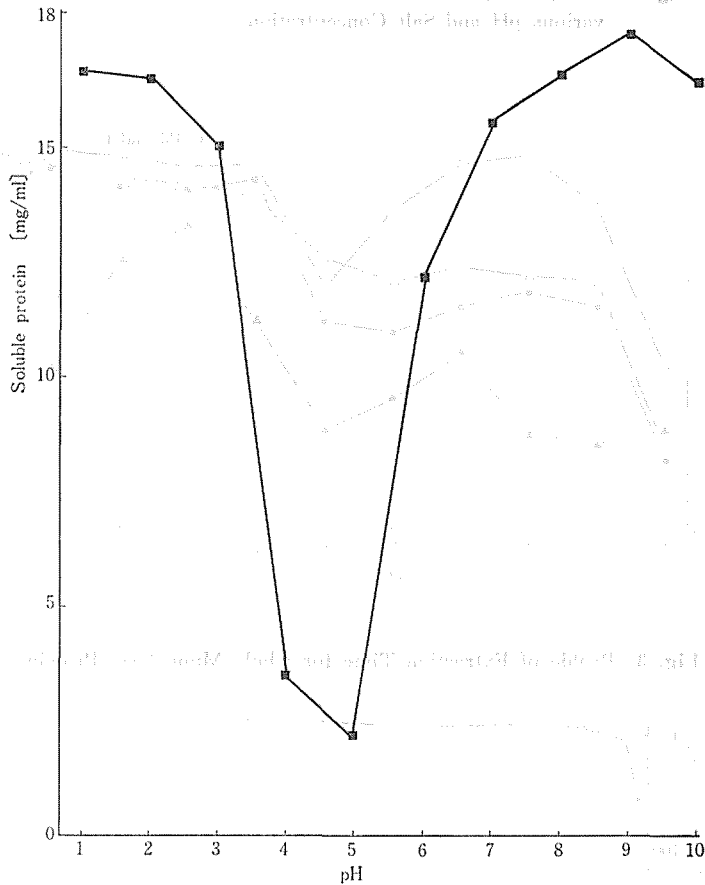
Table. 1 General Components of Mung Bean

Source Measurement(%)	Taiwan (Tai Chung)	China (Shang hai)	Burma
Moisture	9.9	10.7	9.4
Protein (N 6.25)	24.4	22.8	23.6
Ash	2.2	2.6	2.7
Fiber	6.8	6.0	5.2
Non-fibrous Carbohydrate	55.9	57.1	58.0
Fat	0.8	0.8	1.1

Table. 2 General Components of some Seeds

Source	Mung bean	Lima bean	Pea	Adzuki bean	Kidney bean	Soy bean
Moisture	9.9	11.9	13.4	15.5	16.5	12.5
Protein	24.4	22.9	21.7	20.3	19.9	35.3
Ash	2.2	3.8	2.2	3.3	3.6	5.0
Fat	0.8	1.8	2.3	2.2	2.2	19.0
Fiber	6.8	5.3	6.0	4.3	3.7	4.5
Non-fibrous Carbohydrate	55.6	54.3	54.4	54.4	54.1	23.7

Fig. 1 Effect of pH on Solubility of Mung Bean Isolate (20°C)



を23~24%含みでんぷんに次ぐ緑豆の主要成分であった。産地による成分組成間の差異はほとんど認められなかった。

表2は緑豆と他の豆類の成分を比較したものであり、緑豆タンパク質含量が豆類の中でも高い値を示すことが注目される。また、脂質含量が少ない傾向は他の熱帯産の豆類と同様の特徴であ

る。

2. 緑豆タンパク質の抽出条件

1) pH による影響

pH が溶解性に与える影響を図1に示した。pH 2.0 付近と pH 7.0~pH 10.0 で最大の溶解性を示し、pH 5.0 付近で最小値を示した。これらの結果は大豆をはじめエンドウ豆、ライマメ、ヒヨコマメなど多くの豆類タンパク質に共通した傾向である²⁰⁾。また、溶解性の最小値から緑豆の主要タンパク質の等電点が pH 5.0 付近に存在することが考えられる。

図2に各 pH における塩濃度と溶解度の関係を示した。pH 7.0~pH 10.0 領域では塩濃度に

Fig. 2 Extraction Profile for Whole Mung Bean Protein with various pH and Salt Concentration

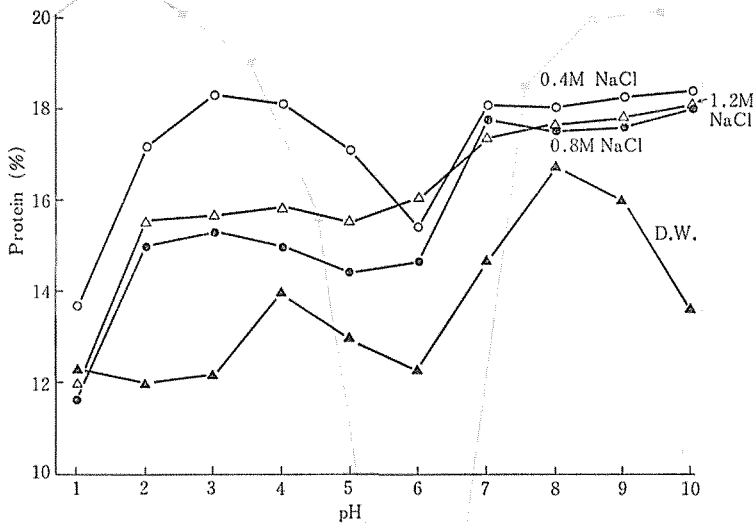
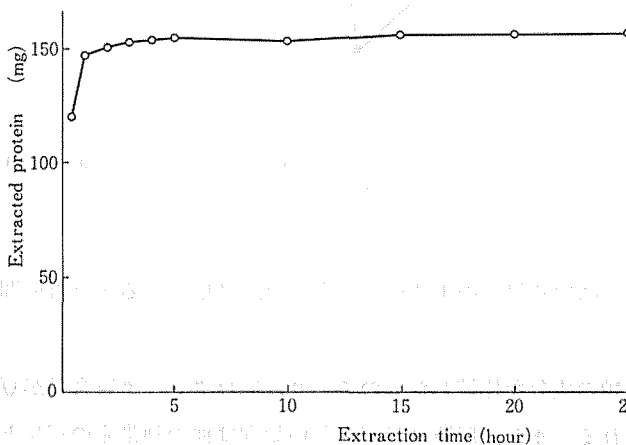


Fig. 3 Profile of Extraction Time for whole Mung bean Protein



よる影響はほとんど認められない。0.4 M NaCl, pH 10.0 の条件で約 96% のタンパク質が溶出され, pH 7.0 において約 93.5% が溶出された。蒸溜水では塩溶液に比較して全般的に低く, pH 7.0 において 0.4 M NaCl 溶液の溶出量の約 80% であった。また, pH 6.0 における溶出量は低い値を示した。

2) 抽出時間および溶媒量

溶解度と抽出時間の関係を図 3 に示した。4 時間~25 時間でほとんど変化が認められなかった。また, 脱脂ミールにたいする溶媒量比については 1 : 10~1 : 25 の範囲で一定の値を得た。

以上の結果より緑豆タンパク質の抽出条件は 0.4 M NaCl, 0.02 M 2-メルカプトエタノールを含む 35 mM リン酸緩衝液, pH 7.5 を抽出溶媒とし (以後, 標準緩衝液とする), 溶媒量比 1 : 10 (W/V), 抽出時間 4 時間が抽出条件として適当であると判断した。

3. 緑豆タンパク質の成分分析

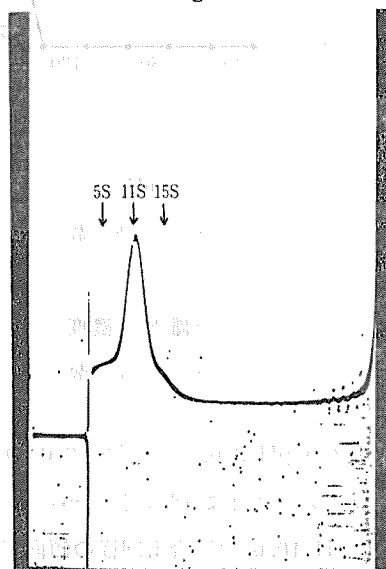
1) 超遠心分析

遠心開始後 30 分の緑豆タンパク質の超遠心沈降パターンを図 4 に示した。各ピークの沈降定数を Svedberg 単位で示した。緑豆タンパク質の主要成分は 11 S 成分で約 95% を占め, 他に 15 S 成分, 5 S 成分が観察された。大豆タンパク質の沈降的組成は 11 S, 7 S, 2 S, 15 S と報告²¹⁾され, それぞれ 41.9, 34.0, 15.0, 9.1% であり, いずれも 11 S 成分が主要成分であるが, 緑豆タンパク質の場合, 11 S が 95% とタンパク質組成の大部分を占めることが特徴的である。

2) ゲル濾過法

280 nm で測定した溶出曲線を図 5 に示す。検出されたピークの面積と乾燥重量は次のとおりであった。

Fig. 4 Ultracentrifugal Pattern of Mung Bean Protein



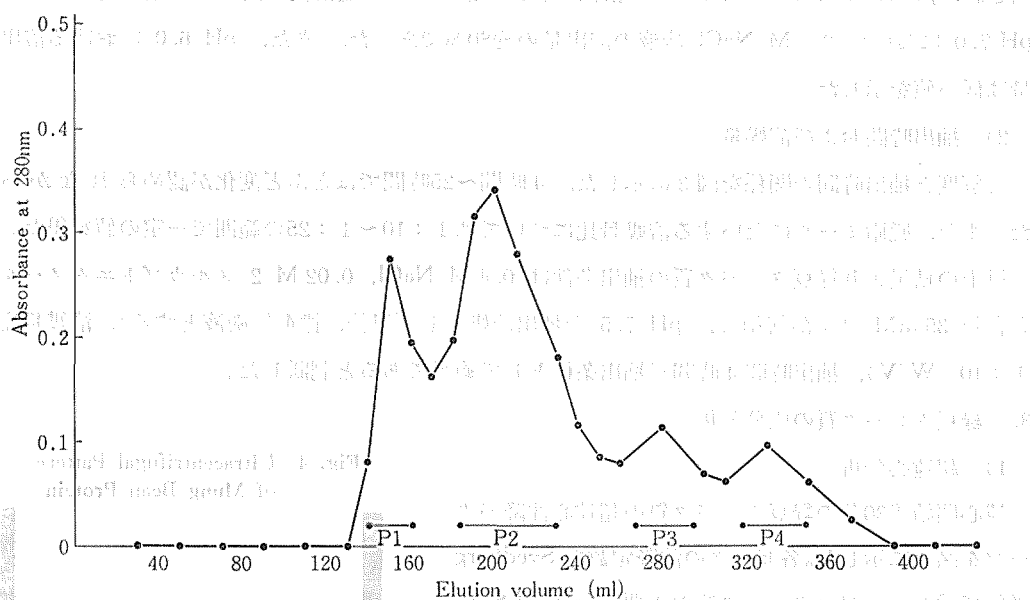
ピーク No.	P 1	P 2	P 3	P 4
積分値 (%)	8.0	77.2	7.8	4.4
乾燥重量 (%)	4.1	81.1	7.2	1.3

上記表より P 2 画分が約 80% を占め, 沈降的組成が示す 11 S 成分に相当する画分と考えられる。

3) PAGE

緑豆タンパク質の分離分析に適したディスク電気泳動の条件を検討するため, ゲル濃度を下記条件に設定し泳動を行った。

Fig. 5 Gel Filtration of Mung Bean Protein (Standard Buffer Isolate)



pH	4.3	8.0	9.4	10.0
バンド数	5	13	10	6
分離ゲル濃度	5.0	7.0	10.0	12.0
バンド数	5	13	3	2

表より pH 8.0, ゲル濃度 7.0 の条件でともに13本のバンドが検出された。pH 2.3 の条件で緑豆タンパク質は分離されなかった。また, pH 4.3 では分離状態は良好であったが再現性が悪く, pH 10.0 の場合も同様の傾向が認められた。各 pH における電気泳動のデンストメーターによるパターンを図6に示した。したがって以後の実験では pH 8.0, ゲル濃度 7.0% で行うこととし, この条件での分離状態とそのデンストメーターによるパターンを合わせて図7に示した。

4. 緑豆タンパク質 11S 成分の精製

得られた結果より緑豆タンパク質の主要成分は, 11S 成分であり, 抽出液より効率的に分離するために塩析法, 冷沈法, ゲル濾過法を試みた。

1) 塩析法

10~100% 硫酸飽和溶液における緑豆タンパク質の挙動を図8に示した。抽出液は黄色に着色しているが, 10~65%飽和の沈澱画分に着色物質が移行した。また各飽和濃度の塩析効果をゲル

Fig. 6 PAGE with various pH Conditions (Densitometric Pattern)

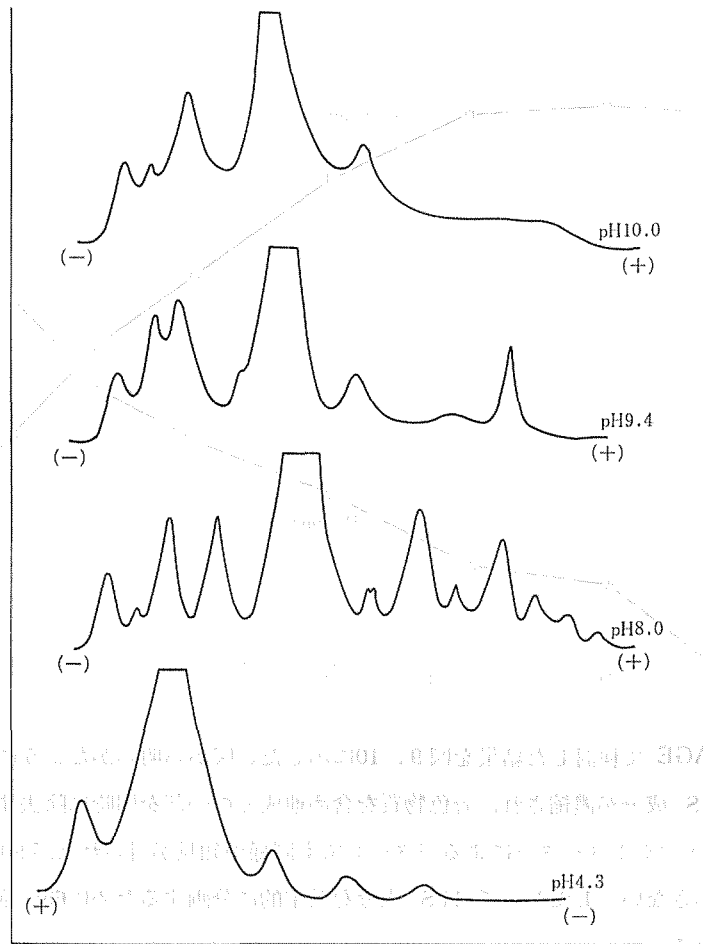


Fig. 7 PAGE Pattern of Mungbean Protein by Densitometric Scanning
Sample was run in 7.0% gel at pH 8.0

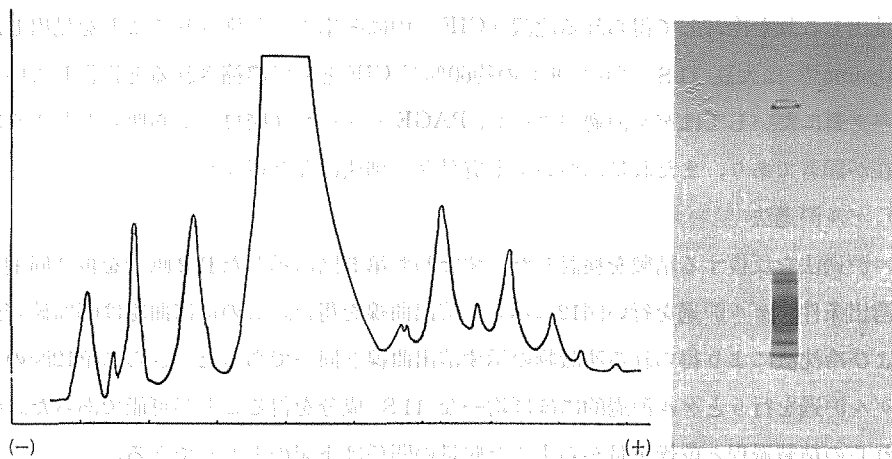
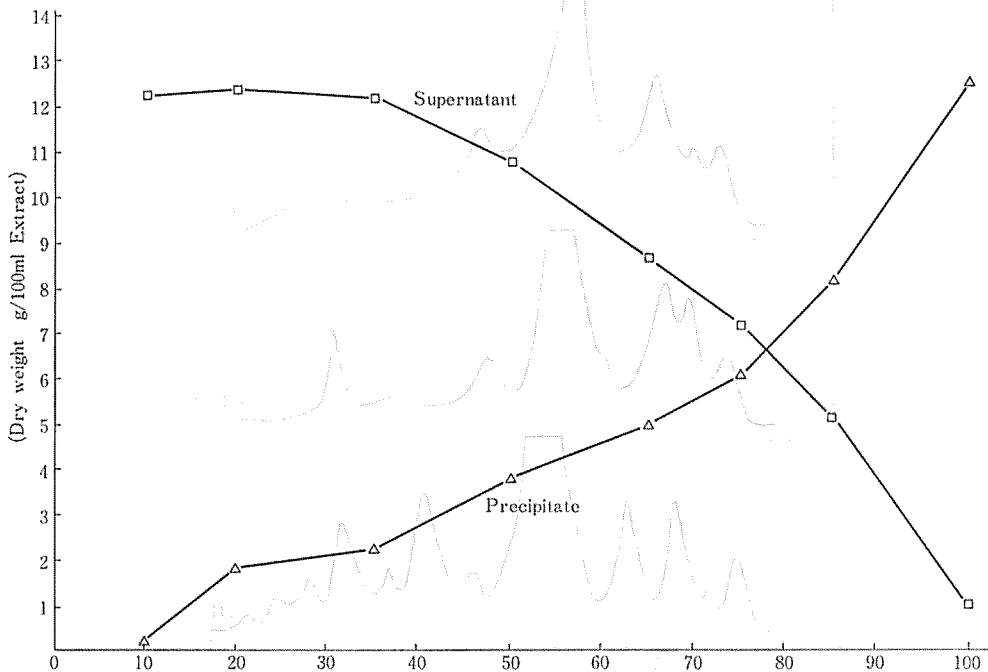


Fig. 8 Salting out Pattern of Mung Bean Extract



沱過および PAGE で検討した結果を図 9, 10 に示した。図から明らかなように 65~95% 飽和の上澄画分に 11S 成分が濃縮され、着色物質を含め他成分の一部を同時に除去することができた。PAGE のデンストメーターによるパターンでも同様の知見が得られたが 90% 飽和では正常なパターンを示さない。したがって 11S 成分を効率的に分画するために 65% 飽和がより有効であると考えられる。

2) 冷沈法

Eldridge と Wolf²²⁾ は大豆タンパク質の主要成分である 11S グロブリンが脱脂大豆ミールを水抽出しこれを冷却して得られる沈澱 (CIF) 中に効率よく分別されることを見出し、また、Koshiyama²³⁾ は大豆 11S グロブリンの約 60% が CIF として濃縮されると報告している。緑豆タンパク質にたいしてはゲル沱過パターン、PAGE パターン (図 11) から明らかなように他成分の混在が顕著であり、また収量についても有効な分別法になり得なかった。

3) ゲル沱過法

ゲル沱過法を反復する精製を検討した。すなわち第 5 図に示した P 2 画分を再び同様のカラム、溶出条件でゲル沱過を行い図 12 に示した溶出曲線を得た。この溶出曲線は 65% 硫酸飽和上澄液および冷沈法により得られる沈澱物の示す溶出曲線と同一であった。さらに第 12 図の A 画分を再びゲル沱過を行うとゲル沱過的にほぼ均一な 11S 成分を得ることが可能であった。(図 13)

これらの精製過程と乾燥重量から求めた収量の関係は下記のとおりである。

Fig. 9 Gel Filtration of Salting out Fraction (Supernatant)

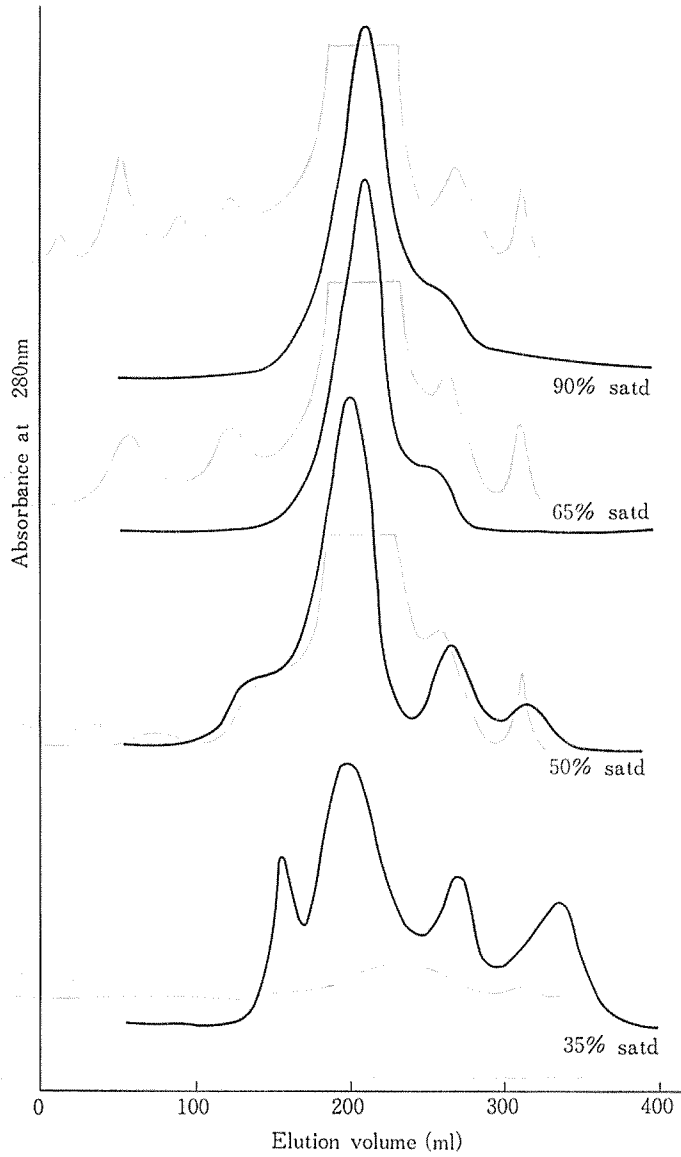


Fig. 10 PAGE Pattern of Salting out Supernatant Fraction by Densitometric Scanning

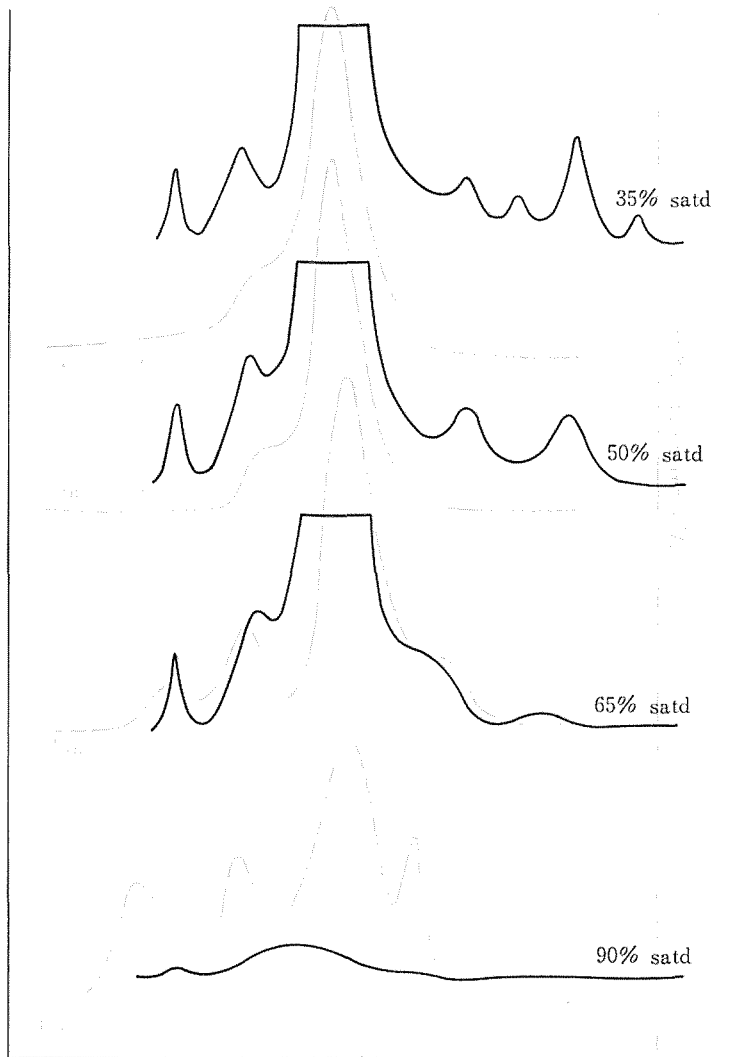


Fig. 11 PAGE and Gelfiltration of Mung Bean Protein 'CIF'

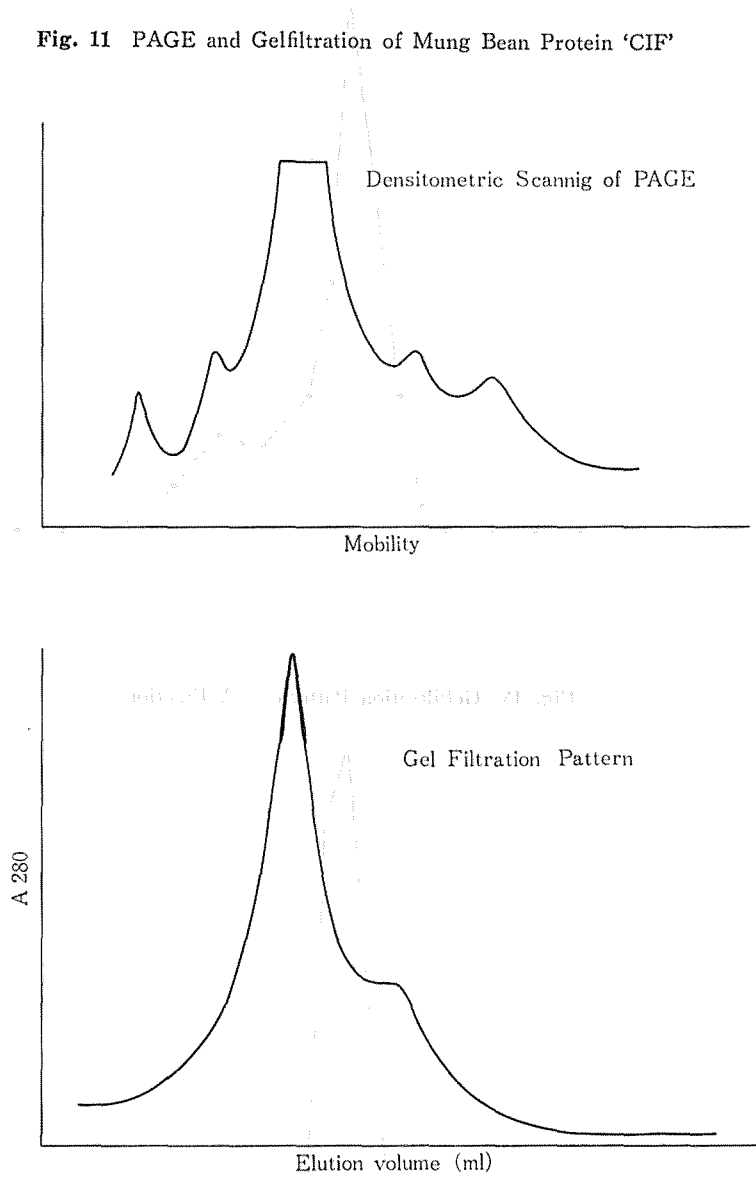


Fig. 12 Rechromatogram of P2 Fraction

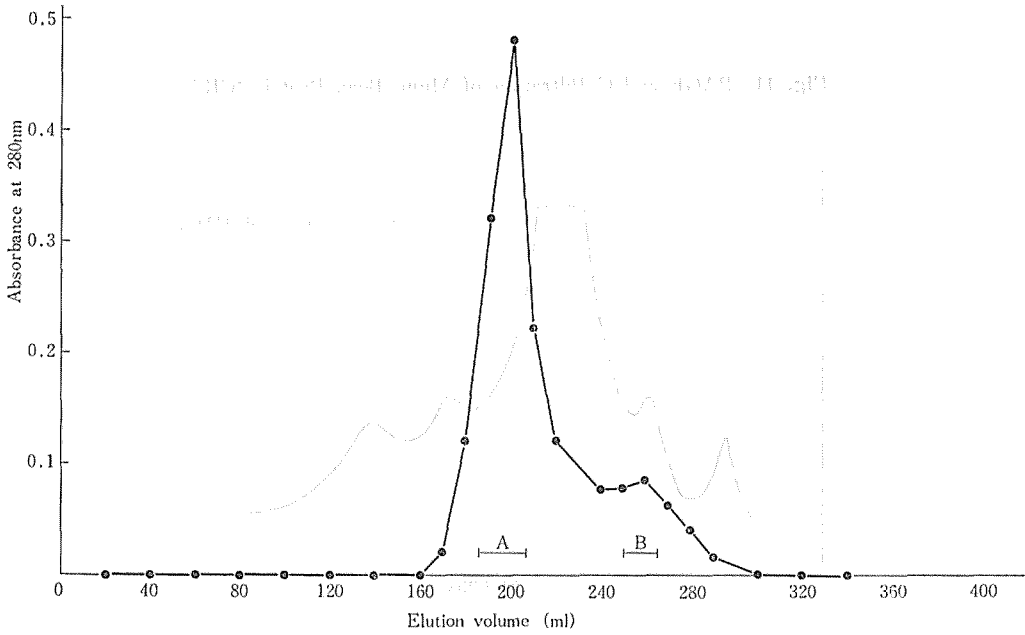


Fig. 13 Gelfiltration Pattern of A Fraction

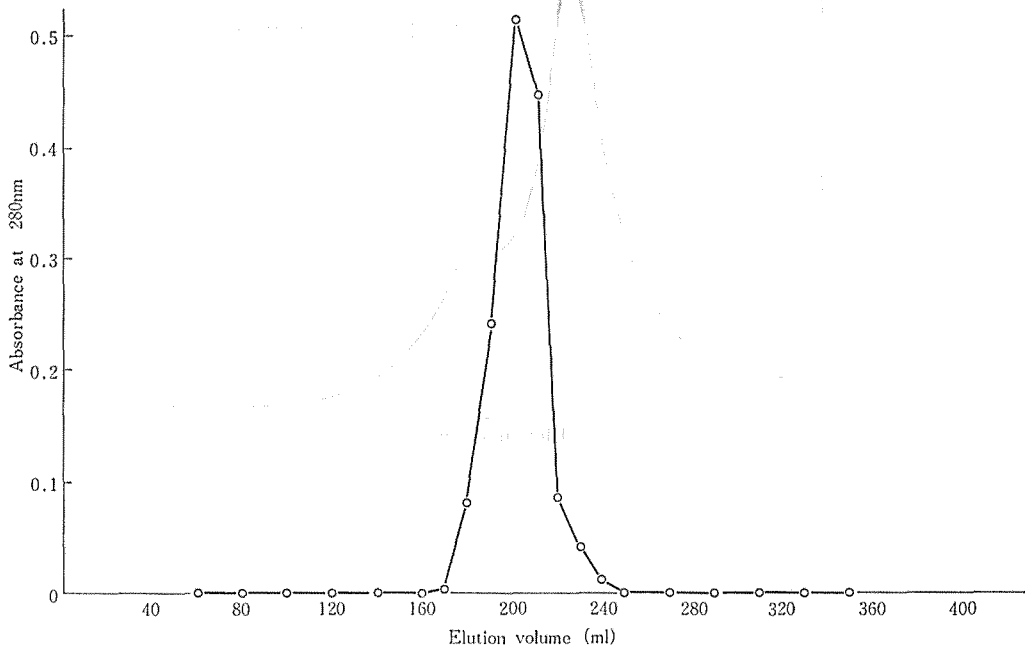


Fig. 14 Final Purification of 11S Protein by Ionexchange Chromatography with DEAE-Cellulofine

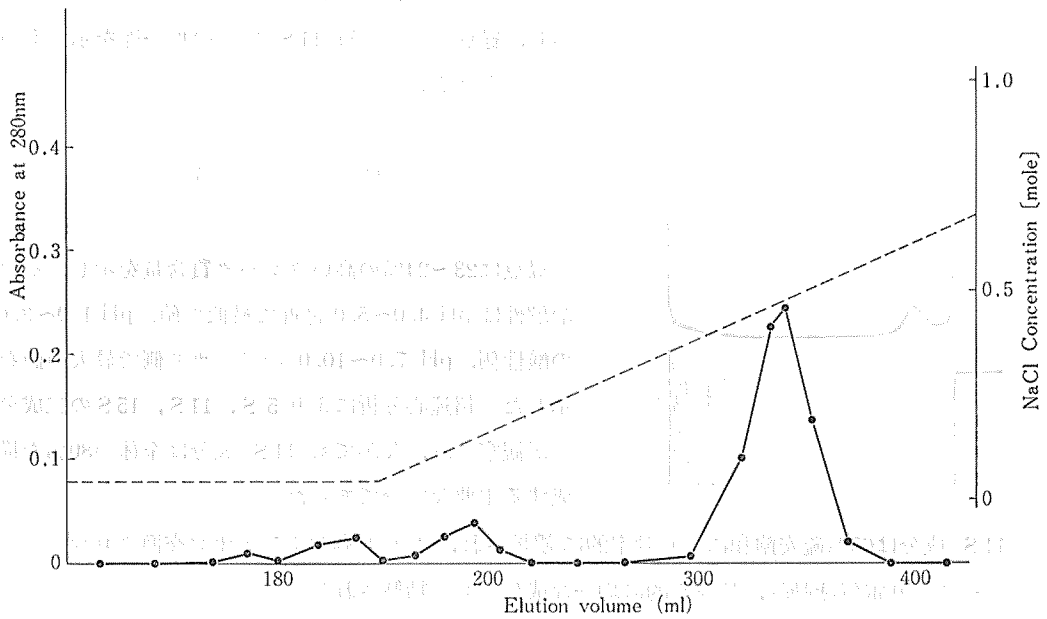
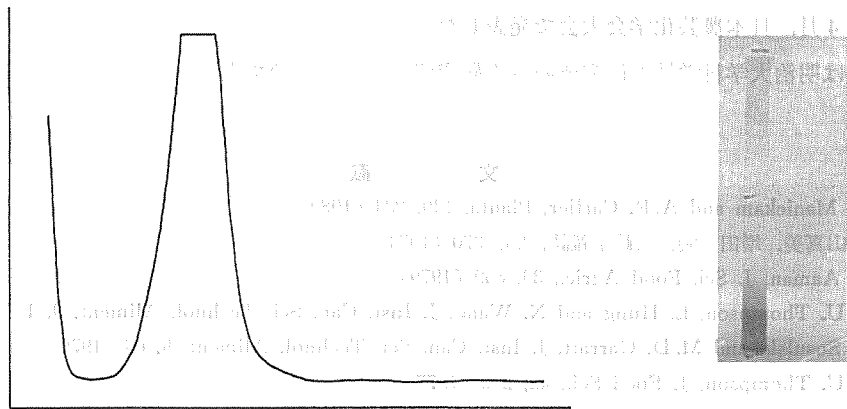


Fig. 15 PAGE of Purified 11S Protein and its Densitometric Scanning Pattern



- i) 抽出液→ゲル濾過→ゲル濾過→ゲル濾過 収量 約18.7%
- ii) 抽出液→65%飽和上澄区→ゲル濾過→ゲル濾過 // 40.5%
- iii) 抽出液→冷沈法沈澱物→ゲル濾過→ゲル濾過 // 26.8%

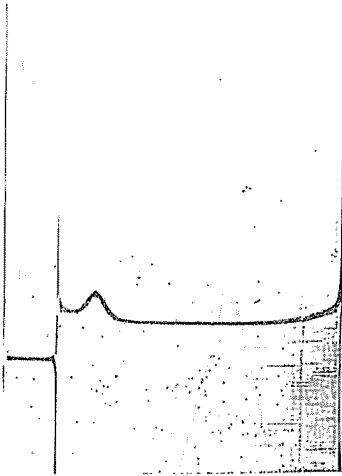
結果として塩析法を含めた ii) の方法が緑豆タンパク質 11S 成分の精製法として適法である。

4) イオン交換クロマトグラフィー

ゲル濾過的に均一な試料の PAGE パターンから 11S 成分の他数本のバンドが認められた。

これらを除去するために DEAE イオン交換クロマトグラフィーを行い結果を図14に示した。得

Fig. 16 Ultracentrifugal Pattern of Purified 11S Protein



られた画分の PAGE-デンストグラムおよび超遠心パターンを図15, 16に示した。いずれも単一のピークを示し, 緑豆タンパク質 11S 成分の均一性を示すものと考えられる。

要 約

緑豆は23~24%の高いタンパク質含量を示し, その溶解性は pH 4.0~5.0 付近で最低の値, pH 1.0~3.0 の酸性側, pH 7.0~10.0 のアルカリ側で最大の値を示した。超遠心分析により 5 S, 11 S, 15 S の三成分が観察され, なかでも 11 S 成分は全体の80%を構成する主要な成分であった。

11 S 成分は65%硫酸飽和により効率的に濃縮され, ゲル透過およびイオン交換クロマトグラフィーにより電気泳動的, 超遠心的に均一な成分として精製された。

終りに臨み終始ご助言をいただいた本学陶山好夫教授に厚く御礼申し上げます。本研究の概要は1984年4月, 日本農芸化学会大会で発表した。

本研究は明治大学科学技術研究所の重点研究費によったものである。

文 献

- 1) A. Manickam and A. R. Carlier, *Planta*, 149, 234 (1980)
- 2) 亀山真美, 増田 勉, *家政学雑誌*, 25, 370 (1974)
- 3) P. Aaman, *J. Sci. Food Agric.*, 30, 869 (1979)
- 4) L. U. Thompson, L. Hung and N. Wang, *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment*, 9, 1 (1976)
- 5) S. Sosulski and M. D. Garratt, *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment*, 9, 66 (1976)
- 6) L. U. Thompson, *J. Food Sci.*, 42, 202 (1977)
- 7) *Official methods of analysis A. O. A. C. Washington* (1980)
- 8) O. H. Lowry, N. J. Rowe, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 9) M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976)
- 10) W. L. Vanes and J. H. Wisse, *Anal. Chem.*, 6, 135 (1963)
- 11) J. D. Baruch, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404 (1964)
- 12) L. Ornstein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 321 (1964)
- 13) O. E. Williams and R. A. Reisfeld, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 373 (1964)
- 14) H. Tamura and N. Ui, *J. Biochem.*, 71, 543 (1972)
- 15) R. A. Reisfeld, U. J. Lewis and D. E. Williams, *Nature*, 195, 281 (1962)
- 16) *生化学実験講座 I, タンパク質の化学* (1976)
- 17) A. H. Reisner, P. Nemes and C. Buchalaty, *Anal. Biochem.*, 64, 509 (1975)

緑豆に関する食品化学的研究

- 18) T. S. Meyer and B. L. Lamberts, *Biochem. Biophys. Acta*, 107, 144 (1965)
- 19) *Methods in Enzymology* Vol. 1, p. 67 (1955)
- 20) T. Y. Fan and F. W. Sosulski, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 7, 256 (1974)
- 21) 越山育則, 植物酵素蛋白質研究法, 共立出版 p. 456 (1976)
- 22) A. C. Eldridge and W. J. Wolf, *Cereal Chem.*, 44, 645 (1967)
- 23) I. Koshiyama, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 4, 167 (1972)