

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：34513

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500942

研究課題名(和文)油糧種子脱脂粕の有効利用に向けた基盤的研究

研究課題名(英文)Studies aimed at effective use of the residue from defatted oilseeds

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) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：油糧種子は、植物油の供給源であるが、その脱脂粕はタンパク質含量が高いにもかかわらず、食料素材とされずに肥料や飼料として利用されている。そこで、これらのタンパク質の特性を明らかにした。エゴマ(シソ科)タンパク質の主要タンパク質の溶解度、アミノ酸組成、サブユニット組成を明らかにした。ゴマ(ゴマ科)タンパク質の酵素分解物を用いて酵母を培養すると、生育促進、冷凍耐性付与されることを見出し、その作用機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Considerable recent interest has been focused on the residue from defatted oilseeds because of their high protein content. To examine the possibility of using perilla and sesame proteins as a new food ingredient, we investigated their nutritional and biochemical properties. I clarified solubility, amino acid composition, and subunit composition of major proteins in perilla seeds. Furthermore, I showed that the number of cultured yeast cells in sesame peptide medium was approximately 4 times that in bacto peptone medium. The cells cultured with sesame peptides acquired improved tolerance to freeze-thaw stress after frozen storage. We further investigated the mechanisms of the improved tolerance.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ゴマタンパク質 エゴマタンパク質 冷凍耐性

### 1. 研究開始当初の背景

油糧種子の脱脂粕利用の取り組みは、ダイズについて多くの研究がなされてきた。しかしながら、油糧種子として広く利用されているゴマ、エゴマ、ナタネ、ベニバナ、ヒマワリなどは、脱脂粕中のタンパク質含量が 20~50%と高いにも関わらず、食料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、肥料・飼料として利用されるのみである。これは、含有する各タンパク質の特性に関する知見が蓄積していないことが原因と考えられる。

研究代表者は、エゴマ種子脱脂粕には 40%ものタンパク質が含まれ、そのアミノ酸組成は、リジンが若干不足するものの必須アミノ酸をバランスよく含むことを見出した。さらに、エゴマタンパク質は約半分を単一グロブリンが占め、そのサブユニット構造を明らかにするとともに、加熱ゲル形成能を有し、保水性に優れていることを見出している。

### 2. 研究の目的

本研究は、油糧種子中の主要なタンパク質の特性を明らかにし、食料素材として最適な利用法を提案することを目的とした。ターゲットとして、エゴマ(シソ科)、ゴマ(ゴマ科)を主に取り上げた。また、タンパク質そのものが加工特性や生理活性を有さなくとも、プロテアーゼによる分解で生じるペプチド群が、新たな活性を発現する場合があります。食品素材としてのタンパク質の新しい利用法が注目されている。そこで、本研究では、油糧種子の脱脂粕を有効に利用するため、含有するタンパク質そのもの、タンパク質分解物の食品素材としての可能性を探ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 種子脱脂粕の作成

種子を粉碎後、10倍量の n-ヘキサンを用いて3回脱脂した。残存する n-ヘキサンをドラフトで蒸発させ、デシケーター中で保存した。

#### (2) エゴマタンパク質の解析

##### タンパク質の分画

脱脂粕 50 g に 10 倍量の 2% NaCl 溶液を加え、1時間攪拌し抽出した。抽出液を 4 で蒸留水に透析し、透析液を遠心分離(14,000 g、15 min)した。上清(アルブミン画分)沈殿(低分子グロブリン画分)を回収し、凍結乾燥した。また、2% NaCl 溶液抽出の沈殿画分を、10% NaCl 溶液でさらに抽出した。抽出液を 4 で蒸留水に透析し、遠心分離後、沈殿(高分子グロブリン)を回収し、凍結乾燥した。得られた各タンパク質を SDS-PAGE により分析した。

##### 溶解度の測定

タンパク質サンプル 20 mg に蒸留水 20 ml を加え、攪拌しながら 0.1N の HCl もしくは

NaOH を加え、pH3~12 に調整した。30 分の攪拌後、遠心分離(12100 g、10 分)を行い、上清を回収した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンをスタンダードとして、Protein Assay Rapid kit Wako(和光純薬工業)を用いて測定した。

各 pH のタンパク質溶解度は、(上清中のタンパク質量)÷(サンプル中のタンパク質量)×100 により求めた。

##### 酵素分解

高分子グロブリン画分 10 g に 200 ml の蒸留水を加え、1N NaOH を用いて、pH 10 に調整し、50 で 1 時間攪拌した。そして、pH 8 (パパイン分解用)、pH 9 (サーモリシン分解用)に調整し、10 mg の酵素(0.1% w/w)を加え、3 時間反応させた。なお、パパインは 37、サーモリシンは 60 で反応させたを行った。

#### (3) ゴマタンパク質分解物による酵母冷凍耐性の改善

##### 菌体、培地

市販のパン酵母(日清フーズ)を使用した。また、Bacto peptone (BP) 培地(2% グルコース、3% BP (pH 5.5))、Casein peptone (BP) 培地(2% グルコース、3% CP (pH 5.5)) およびゴマペプチド(SP) 培地(2% グルコース、3% SP (pH 5.5))を調整した。BP と CP はそれぞれ Becton Dickinson 社とナカライテスク社から購入した。SP (Kisco 株式会社製)は、ゴマタンパク質のサーモリシン処理により得られたものであり、その分子量組成は 3000~10000 が 10%、1000~3000 が 37%、500~1000 が 21%、500 以下が 32%と推定されている。菌体は、100 ml の培地で、28、120 rpm の震盪培養で定常期まで培養した。

##### 冷凍耐性の測定

培養した酵母を、蒸留水で洗浄後、10 mM リン酸緩衝液(pH7.0)を用いて、吸光度(610 nm)が 1.0 になるように懸濁した。この懸濁液 100 μl を 1.5 ml 用チューブに入れ、-30 で 10 日間冷凍貯蔵した。解凍後、YPD 培地(2% グルコース、2% ペプトン、1% 酵母エキス、2% 寒天 (pH5.5))を用いて、生存する酵母の菌体数を測定した。冷凍耐性は、凍結前の生菌数に対する、凍結後の生菌数の割合(%)により評価した。

##### 発酵能の測定

小麦粉 350 g、培養した酵母 10.5 g、食塩 7 g、ショ糖 17.5 g、蒸留水 217 ml を混ぜ、捏ね機を用いてパン生地を調整した。パン生地を 70 g ごとに丸め、-30 で 7 日間冷凍貯蔵した。解凍および発酵は 37 で行い、発酵能は生地の体積を測定することにより求めた。

##### 細胞内因子の解析

培地から酵母を遠心分離により回収し、蒸留水で洗浄後、蒸留水で用いて懸濁した。懸濁液を 10 分間 100 で加熱して、菌体内の化合物を得た。

アミノ酸分析は、アミノ酸分析計を用い、定法に従った。グリセロールおよびトレハロースの測定は、それぞれ F-kit Glycerol (Roche Diagnostics 製)、K-TREH (Megazyme International Ireland 製) を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) エゴマ脱脂粕中の主要タンパク質の解析

エゴマタンパク質は、アルブミンが約 11%、グロブリンが約 84% を占めることを既に見出している。また、グロブリンは、脱脂粕から 2% NaCl 溶液で抽出される低分子グロブリンと、引き続き、10% NaCl 溶液で抽出される高分子グロブリンから構成される。全タンパク質に対して、低分子グロブリンは約 17%、高分子グロブリンは約 64% を占めることを、既に見出している。

##### 高分子グロブリンの溶解度と可溶性

高分子グロブリンは、リジン以外の必須アミノ酸をバランスよく含んでいる。主要グロブリンは分子量が約 340,000 と推定され、分子量 31,000~34,000 の 3 種類の酸性サブユニットと、分子量 23,000~25,000 の 4 種類の塩基性サブユニットが、ジスルフィド結合により 1:1 に会合した、分子量 54,000~59,000 の 3 種類の間サブユニットからなる 6 量体と推測している。また、高分子グロブリンは、加熱によりゲル化することを見出している。

高分子グロブリンの溶解度を検討した。蒸留水に対する溶解度は、pH 3 で 98% であるが、pH 4 で 12%、pH 5~7 では 3% 以下であった。pH 8、9、10 では、それぞれ 8%、50%、96% であり、pH 4~8 では溶解度が極めて低かった。イオン強度をあげると、中性付近の溶解度は改善されるものの、pH 4~6 の弱酸性下の溶解度は依然低かった。

タンパク質は断片化すると、溶解性が向上する場合がある。そこで、高分子グロブリンを、食品工業でも用いられているタンパク質分解酵素であるパパイン、サーモリシンで加水分解した。パパイン消化では、高分子グロブリンの分解は、ほとんど行われなかった。パパインによる切断予定部位が、タンパク質の立体構造の内側に存在していたためと考えられる。一方、サーモリシンにより効率的に低分子化され、生成したペプチドは Native な高分子グロブリンと比較して、溶解性が大きく改善した。また、低分子化により、乳化性も大きく向上した。現在、詳細な解析を行っている。

##### 低分子グロブリンの解析

低分子グロブリンは、分子量が約 13,000 と推定され、分子量約 9,000 のサブユニットと分子量約 4,000 のサブユニットが、ジスルフィド結合により 1:1 に会合していると推測できた。

##### アルブミン

アルブミン画分には、分子量が約 8,000~

12,000 のタンパク質の集合体であった。

##### (2) ゴマタンパク質分解物による酵母冷凍耐性の改善

ゴマタンパク質分解物による酵母細胞の生育促進効果

培地成分として、各タンパク質分解物を利用した際の、酵母細胞の生育に対する効果を検討した。

図 1 は、各培地を培養した際の菌体収量を表している。ゴマペプチド(SP)培地で培養した際の回収された菌体量は、Bacto peptone (BP)培地の約 3.8 倍、Casein peptone (CP)培地の約 1.4 倍と多く、培養効率が高いことが分かった。

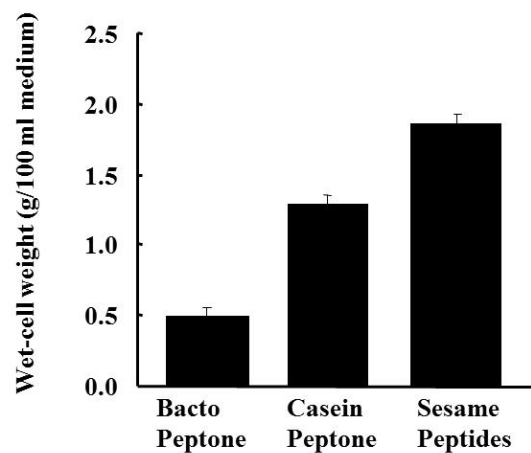


図 1 各培地での菌体重量

##### 酵母冷凍耐性の改善

ゴマペプチドで培養した細胞の冷凍ストレス耐性について検討を行った。ゴマペプチドで培養した酵母は、約 67% の細胞が生き残っており、BP 培地の 14%、CP 培地の 40% と比較して、高い生存率を示した (図 2)。

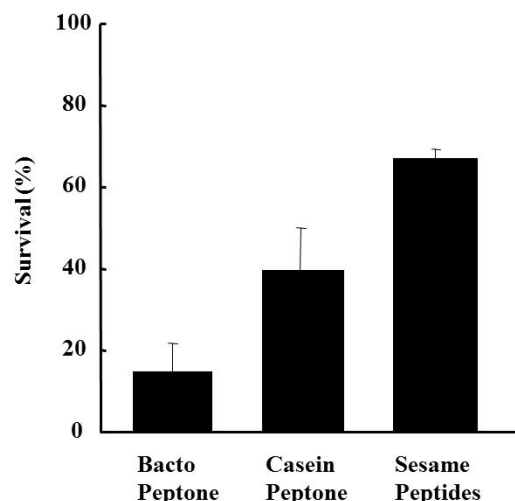


図 2 各培地で培養した酵母の冷凍耐性

次に、冷凍耐性改善の解析を行った。細胞

内のトレハロースやグリセロール、アミノ酸レベルが酵母の冷凍耐性に影響を及ぼすことが報告されている。これらの細胞内レベルを測定したところ、トレハロースとグリセロールについては、培地成分の影響は見られなかった。一方、冷凍耐性を付与するとされているプロリンの濃度が、他の培地での培養と比較して、上昇していることが分かった。したがって、ゴマペプチドの培養により、酵母細胞が冷凍耐性を獲得したのは、細胞内プロリン濃度が上昇したことが一因であると考えられた。

#### パン生地には及ぼす影響

パン生地として冷凍保存した場合の効果について検討した(図3)。

SP、CPで培養した酵母は、いずれも良好な発酵力を示した。ところが、1週間冷凍したパン生地では、培養した培地によって、解凍後の残存発酵力に大きな差が確認された。CPで培養した酵母を用いたパン生地は、十分な膨張が見られなかった。一方、SPで培養した酵母を用いたパン生地は、冷凍しなかったパン生地と、ほぼ同程度の膨張が確認できた。SP培地で培養した酵母は、パン生地中であっても凍結後の生存率が高いため、高い発酵力を示したと考えられる。

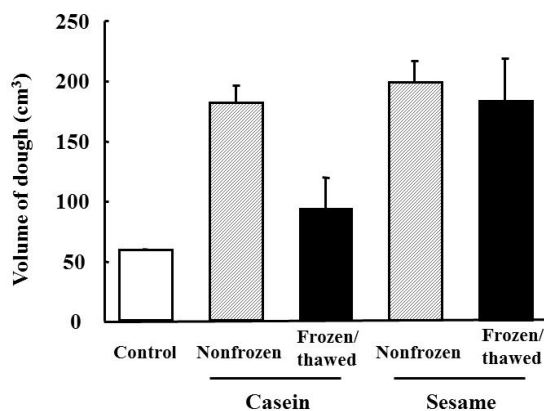


図3 各培地で培養した酵母を用いた冷凍パン生地の発酵能

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 1件)

『生化学・基礎栄養学』朝倉書店(池田彩子・小田裕昭・石原健吾 編)

第2章 酵素 : p.6~12、

第5章 たんぱく質、アミノ酸の構造・代謝と栄養の部分 : p.35~42、

第13章 エネルギー代謝 p.135~142を執筆。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 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