

肉蛋白質と大豆蛋白質の相互作用

— SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に及ぼす加熱の影響 —

志 賀 勝 治

広島大学生物生産学部
1980年10月11日受理

Interaction between Meat Protein and Soybean Protein — Effect of Heating on SDS Polyacrylamid Gel Electrophoresis Patterns —

Katsuji SHIGA

Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University Fukuyama

(Figs. 1-4, Tables 1)

蛋白質資源の見通しに対する不安感から、植物蛋白質、とくに大豆蛋白質の有効利用が考えられている。したがって、大豆蛋白質が動物蛋白質食品と混合される機会が増大し、大豆蛋白質を添加した肉製品も市販されるようになって来た。

これまで畜肉蛋白質に大豆蛋白質を添加した場合の両蛋白質の相互作用に関する報告^{1)~10)} はかなりあるが、畜肉蛋白質および大豆蛋白質ともその構成蛋白成分が複雑であるため、まだ不明な点が多い。

肉製品製造においては、塩漬、くん煙および加熱などの操作があるが、両蛋白質の相互作用が最も問題となるのは、加熱処理における相互作用である。それで今回は畜肉蛋白質に大豆蛋白質を混合し、この混合物を70℃と100℃で加熱して、この時生ずる加熱変性を畜肉および大豆蛋白質単独の場合と比較検討した。

材 料 と 方 法

畜肉材料：今回は均一な試料が入手し易い鶏の胸肉を使用した。鶏肉は脂肪と結合組織を除いた後、小型チョッパー（プレート穴3mm）を2回通してひき肉として使用した。

大豆蛋白質：フレック状の脱脂大豆に10倍量の水を加え、攪拌しながら、N-NaOHを加えてpHを6.8~7.0にし、約1時間後、布濾過および遠心分離して不溶部を除く。得られた抽出液に、N-HClを攪拌しながら加えpHを4.5とする。生じた微細な沈殿は遠心分離(5,000rpm, 15分)する。分離した蛋白質は水で懸濁後遠心分離する方法で2回洗浄する。得られた分離大豆蛋白は、固形分約40%の、そのままでは水に不溶の沈殿なので、使用時に、沈殿10部に0.02Mリン酸緩衝液(pH 7.2) 7部を加え乳鉢ですり潰し、さらにN-NaOHを加えてpH 7.0として溶解する。最終量が約20部になるように水で調節する。

なお、沈殿を直ぐに使用しないときは冷蔵するが、長期貯蔵すると溶解度が減少することがあるので、なるべく早く使用した。

混合試料：鶏肉と大豆蛋白質の混合試料は上記のひき肉と溶解した分離大豆蛋白質を等量混合して使用した。

加熱操作：前述のひき肉，溶解した分離大豆蛋白質および両者の混合試料は，それぞれ5gずつ試験管（内径20mm）に秤量し，サララップで密栓後加温した。加熱温度は，ソーセージやハムなどの湯煮に用いられる70℃と食品の加熱処理でもっとも普通な100℃とした。加熱時間は70℃のときは30分，100℃のときは15分とした。

水溶および塩溶性蛋白質の抽出：加熱処理をした試料および未加熱の対照試料は，図1に示したとおりの方法で処理した。すなわち，5gの試料を加熱用試験管より，40mlの0.02Mリン酸緩衝液（pH 7.2）により流し出し，ホモジナイザーにより摩砕する。このとき極端に泡立たせると後の操作が困難になるので注意する。大豆蛋白質のみのときは，ホモジナイザーを使用せず小型乳鉢を使用して摩砕した。細かに摩砕した後，約10分静置後，20,000 xg で15分間遠心分離して上澄を採取し，沈殿は再度40mlのリン酸緩衝液で抽出する。2回分の抽出液を合わせて水溶性蛋白区分（フラクションA）とする。

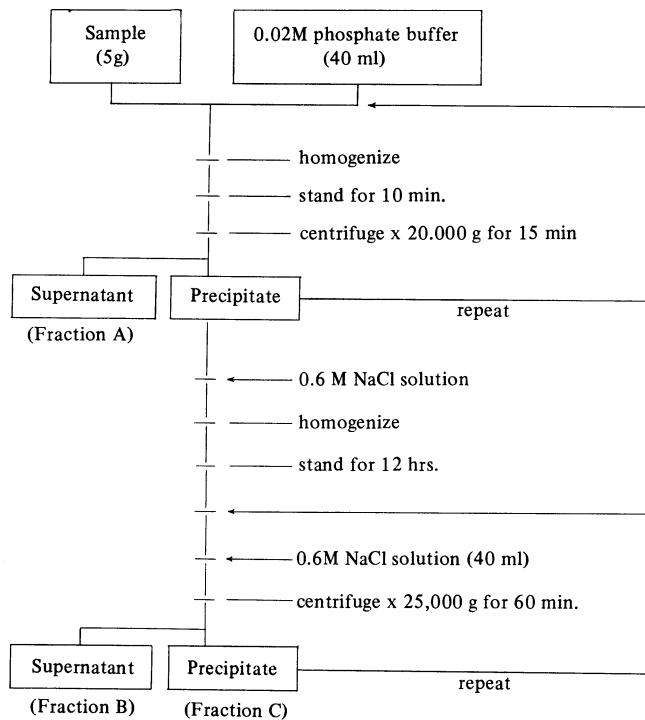


Fig. 1. Method of protein extraction

沈殿は，30mlの0.6 M NaCl，0.04 M $-\text{NaHCO}_3$ ，0.01 M $-\text{Na}_2\text{CO}_3$ 液（以後0.6 M NaCl 抽出液と略す）を加えてホモジナイズし1夜放置する。これにさらに0.6 M NaCl 抽出液40mlを加え，良く攪拌した後，25,000 xg で60分遠心沈殿する。上澄を採取し，沈殿はさらに40mlの0.6 M NaCl 抽出液で再度抽出する。2回分の抽出液を合わせて塩溶性区分（フラクションB）とする。残渣は，フラクションCとする。

S D S ポリアクリルアミド電気泳動：電気泳動は，WERBER - OSBORN らの方法¹²⁾¹³⁾に準じて行ったが，ガラス管を使うディスク法の代りに平板を使った，いわゆるスラブゲル法を使用した。

前述の各抽出区分，フラクションA，BおよびCは，50%グリセロール，2% SDS，2% 2-メルカプトエタノール，を含むpH 7.2の0.02 Mリン酸緩衝液（蛋白溶解液）を等量加えた後，60℃で30分加温した。また，フラクションBは塩濃度が高いので，前記蛋白溶解液を水で2倍にしたものを外液として1

夜透析し、フラクションCは全部溶解しないので、不溶部は遠心分離して除去し、上澄は適当な蛋白質濃度に希釈して、電気泳動用試料とした。

電気泳動は、アクリルアミド濃度10%の平板ゲル(15cm×13cm×2mm)を使用し、30mAで約16時間泳動した。泳動後0.25%クマシーブリリアントブルー染色液(10%酢酸, 50%メチルアルコール液中)で1~2時間染色後、7%酢酸, 25%メチルアルコール液で余分の色素を除去する。

各区分の窒素分布の測定: 各区分に移行した窒素の割合はセミマイクロゲル法によって測定して算出した。

結果と考察

1. 溶解性におよぼす加熱の影響

鶏肉, 分離大豆蛋白質および両者の混合試料を加熱した場合の, 水溶性区分, 塩溶性区分および不溶区分に移行する窒素の分布を無加熱の対照と比較した結果は, 表1に示したとおりである。

Table 1. Nitrogen distribution in each fraction (%)

Heating temp (C°)	Fraction								
	A			B			C		
	R	70	100	R	70	100	R	70	100
Meat	40.8	14.8	14.8	28.9	1.9	1.8	30.3	83.3	83.4
Soyabean	88.1	37.8	22.5	1.5	2.3	1.4	8.5	59.9	76.1
Mixture	63.8	34.9	23.0	17.6	2.8	3.4	18.6	62.3	73.6

A: Water-soluble fraction R: unheated
 B: 0.6M NaCl-soluble fraction
 C: Insoluble fraction

筋肉の水溶性区分は, 筋肉の筋漿蛋白質区分に相当し, 水溶性の非蛋白態窒素も含まれている。全鶏肉試料の窒素に対するこの区分の窒素の割合は約40%であったが, 70°Cおよび100°C加熱処理により, 約15%まで減少した。この区分の蛋白質の大部分は熱に不安定なものが多いこと, 70°C加熱ですでに15%まで減少し, さらに100°Cまで加熱しても窒素含量が減少しないことから, この約15%の窒素は, 熱に安定な成分(非蛋白態の窒素化合物)であることが考えられる(このことについて, さらに電気泳動のところで述べる予定)。

筋肉試料の塩溶性区分は, いわゆる筋肉の構造蛋白質(ミオシン, アクチンなどの)区分に相当し, 全鶏肉の約29%の窒素を示した。しかし, 加熱により, この区分の窒素は大巾に減少して2%以下となった。加熱温度を70°Cから100°Cに上昇してもその値はほとんど変化しなかった。ミオシン, アクチンなどの溶液の熱変性が60~70°Cで起ると報告されている²⁾⁶⁾が, 肉中における構造蛋白質も, 70°Cで0.6M NaClに, ほとんど不溶となったと考えられる。

分離大豆蛋白質も鶏肉の場合と同様に処理して, 各区分に移行する窒素の割合を測定した。大豆蛋白質の場合は, 酸沈殿した試料を溶解して蛋白質濃度20%前後のゲル状溶液を作るときの条件(pH, 濃度など)を一定にすることが困難であったため, 測定値に多少のばらつきがあったが, 水溶性区分は, 生は88%前後の値を示し, 70°C加熱により約38%, 100°C加熱により約23%と減少した。以上のように大豆蛋白質の変熱性温度は筋肉蛋白質より, かなり高いことがわかった。

大豆蛋白質の塩溶性区分は筋肉蛋白質の場合のような意味はないが, 鶏肉の場合と同様の測定をした。その結果, 水に不溶であった沈殿からは, 生, 70°Cおよび100°C加熱のいずれの場合も, ごく少量しか塩溶区分に移行しなかった。

4本のバンド中移動度の遅い2本のバンド（大豆の7S蛋白のサブユニットに相当する¹⁴⁾）の量が減少し、100℃加熱により、移動度の最も速いバンド（大豆11S蛋白質のサブユニットの1つに¹⁴⁾相当）が減少したが、大豆の11S蛋白質の移動度の遅い方（分子量の大きい）のバンドは量的にやや減少したが最後まで明瞭であった。（Fig. 3-A）

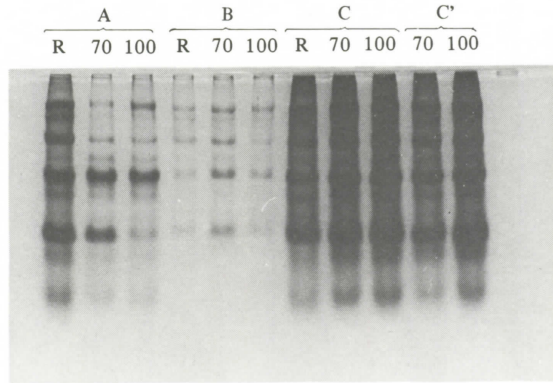


Fig. 3. SDS electrophoretic patterns of soybean protein

Note: A: water soluble fraction R: unheated
 E: 0.6M NaCl soluble fraction 70: heated at 70°C
 C: insoluble fraction 100: heated at 100°C

大豆蛋白質の塩溶性区分に移行した蛋白質量は、生、70℃および100℃加熱のいずれの場合も、量的に少なく各バンドの割合は水溶区分のときと類似していた。（Fig. 3-B）

水および0.6 M NaCl 溶液に不溶の残渣の蛋白質は、生の場合水溶性の蛋白質の泳動図と大きな差がなかった。また、各バンド間の抜けが悪く泳動図全体が不鮮明となった。この理由は明らかでないが、分離大豆蛋白質を調製するとき、とくに酸沈殿するときに生ずる大豆蛋白質のジスルフィド会合物などによる不溶化¹⁵⁾が原因ではないかと考えられる。すなわち、不溶化した蛋白質は水および塩溶液で抽出されず、残渣として残り、これが電気泳動用蛋白質溶解液で溶解されるが、このとき完全に解離されない会合物がテーリングを起したのではないかと考えられるが、このことについてはさらに検討を要する。70℃および100℃加熱の場合の泳動図は生の場合と類似しているが各蛋白質成分の割合が変化していた。今回はデンストメーターによる定量を行っていないので正確な比率は不明であるが、70℃加熱の場合大豆の7S蛋白質が、100℃加熱の場合大豆の11S蛋白質の移動の速いものが増加していた。すなわち、加熱処理により水および塩溶液に不溶になった蛋白質成分が残渣に残存し、水溶性および塩溶性区分で減少した分だけが残渣で増加したことを示している。この傾向は、橋詰らの報告¹⁴⁾とほぼ一致していた。

鶏肉・分離大豆蛋白質混合物の変化：両蛋白質の混合物を鶏肉単独の試料と比較しながら検討した。生の水溶区分は、鶏肉の7つの蛋白質および大豆の4つの蛋白質成分を含有しているが、大豆の7Sの移動の遅いバンドと、大豆の11Sの移動の速いバンドは鶏肉の7つのバンドと重複せず、全部で9つの明瞭なバンドが認められた。70℃加熱により肉漿蛋白質の大部分が、不溶化して、生のときに認められていた9本のバンドのうち、5本が消失し、大豆蛋白質に相当する4バンドのみが残っていた。ただ、筋漿蛋白質と大豆蛋白質が重複しているバンド（たとえば、大豆の11S蛋白質の移動の遅いものと筋漿蛋白質の原点から5番目のもの）については、両蛋白質混在の可能性がある。100℃加熱により、両蛋白質の混合物のバンドはさらに減少し、明瞭なバンドは大豆11S蛋白質の移動の遅いものに相当するもののみで、他のバンドは薄くなった。（Fig. 4aA）

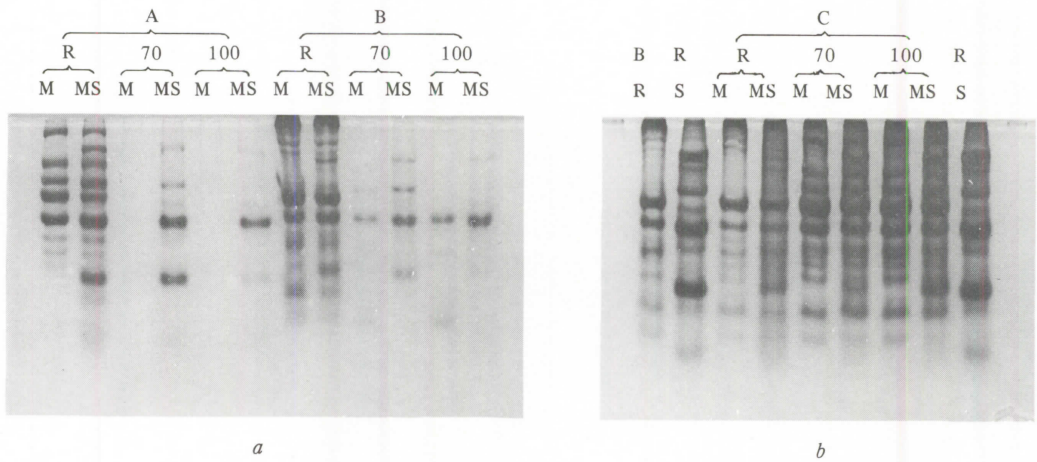


Fig. 4. SDS electrophoretic patterns of the mixture of chicken and soybean protein

Note A: water soluble fraction R: unheated
 B: 0.6M NaCl soluble fraction 70: heated at 70
 S: soybean protein M: meat protein MS: mixture of proteins

生試料の塩溶性区分は、筋肉蛋白質の塩溶性のものと大豆蛋白質が混在しているが、大豆蛋白質のかなりの部分がすでに水溶性区分に移行しているため、その泳動図は鶏肉蛋白質単独のときと似ていた。ただ、大豆の7S成分の移動の遅いものと11Sの移動の速いもののバンドが残っているのが認められた。70°C加熱により、混合物は4本のバンドを示し、大豆蛋白質単独のときと同様のパターンであったが、大豆の11S蛋白質の遅いものに相当するバンドと筋肉蛋白質のトロポミオシンに相当するバンドの位置が重複しているため、その混在の割合はわからない。同様のことが大豆の7Sの移動の早いバンドについてもいえる。さらに、100°C加熱により明瞭なバンドの数は減少し、前述の大豆の11S蛋白質および筋肉のトロポミオシンに相当するバンドだけが残っていた。(Fig. 4aB)

水および0.6 M NaCl 溶液に不溶の残渣は、生の場合には筋肉蛋白質のみのときとはほぼ類似のパターンを示し、これに少量の大豆蛋白質のバンドが重複したものであった。ただ、全体にバンドが鮮明でなく、テリングをした感じは大豆蛋白質の残渣の場合と似ていた。70°C加熱の場合には、生の場合と比較して、バンドの数がかなり増加した。すなわち、鶏肉のみの70°C加熱の場合と同様に肉漿蛋白質が熱変性して残渣に残存すると同時に大豆蛋白質の1部も残渣に残存して明瞭なバンドを示したと考えられる。100°C加熱の場合も同様な傾向であったが、大豆の11S蛋白質に相当するバンドの増加が目立っていた。(Fig. 4b)

鶏肉と分離大豆蛋白質を混合した試料を加熱した場合の泳動図の変化は、それぞれの蛋白質を単独で加熱した場合の変化を、重ね合わせたものに近く、両蛋白質の構成成分間の特異な相互作用を見出すことは出来なかった。今回の実験では、泳動図中のバンドの数と肉眼的濃淡のみでデーターを判断したが、今後さらに、デンストメーターによる定量的解析が必要と考えられる。

また、加熱処理により残渣部に移行したそれぞれの蛋白質成分が、単純に不溶化して移行したのか、いくつかの成分が相互になんらかの結合をして移行したのかは、今回使用した実験方法では解明できなかったため、他の方法で検討する必要がある。

要 約

食肉蛋白質と大豆蛋白質の相互作用を知るため、鶏肉蛋白質、大豆蛋白質および両者の混合物の熱変性を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により検討した。

その結果は次のとおりである。

1. 鶏肉試料の水溶性区分の電気泳動図において、生の場合は7本の明瞭なバンドが認められたが、これらのバンドは70℃までの加熱で消失した。この試料の塩溶性区分に関しては、生の場合は9～10本のバンドが認められ、典型的な筋原線維の蛋白質パターンを示したが、100℃までの加熱で、それらのバンドは1～2本に減少した。
2. 大豆蛋白質の水溶性区分の電気泳動図において、加熱前は4本の主バンドが認められたが、70℃加熱により、移動度の遅い2本のバンドが薄くなり、100℃加熱により、移動の最も速いバンドがいちじるしく薄くなった。この試料の塩溶性区分の電気泳動図は、加熱処理において、水溶性区分と同様のパターンであった。
3. 鶏肉蛋白質および大豆蛋白質を加熱したとき、水溶性および塩溶性区分から消失した変性蛋白質成分は、当然ながら不溶性区分に見い出された。
4. 鶏肉蛋白質と大豆蛋白質とを混合して加熱したときの電気泳動図と、この2つの蛋白試料を別々に加熱したときの電気泳動図とを比較したが、2つの加熱方法におけるこれらの試料中の蛋白質の変化について、大きな違いを見い出せなかった。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、有益なる御助言を賜った農林水産省畜産試験場橋詰和宗博士ならびに宮崎大学農学部芳賀聖一博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 山本克博・深沢利行・安井 勉：北大農学部邦文紀要，**9**，116～126（1973）。
- 2) 芳賀聖一・大橋登美男・深沢利行：宮大農報，**21**，81～96（1974）。
- 3) 芳賀聖一・大橋登美男：食品工誌，**24**，243～249（1977）。
- 4) 芳賀聖一・大橋登美男：食品工誌，**25**，226～230（1978）。
- 5) 芳賀聖一・大橋登美男：食品工誌，**25**，231～234（1978）。
- 6) 山本克博・梶山佳秀・鮫島邦彦：酪農学園大学紀要，**7**，39～45（1977）。
- 7) 芳賀聖一・大橋登美男：食品工誌，**26**，422～428（1979）。
- 8) 芳賀聖一・大橋登美男：食品工誌，**26**，429～433（1979）。
- 9) KOTULA A.W. and ROUGH D.K. : *J. Food Sci.*, **42**, 731-746 (1977).
- 10) KING N.L. : *J. Agric. Food Chem.* **25**, 166-171 (1977).
- 11) LEE Y.B., RICKANSRUD D.A., HAGBERG E.C. and BRISKEY E.J. and GREASER M.L. : *J. Food Sci.*, **40**, 380-383, (1975).
- 12) WEBER K and OSBORN M. : *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 13) LAEMMLI U.K. : *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 14) HASHIZUME K. and WATANABE T. : *Agric. Biol. Chem.* **43**, 683-690 (1979).
- 15) NASH A.M. KWOLEKW F. and WOLF W.J. : *Cereal Chem.* **48**, 360-368 (1971)

Summary

In order to clarify the interaction between meat protein and soybean protein, the heat denaturation of chicken protein, soybean protein and a mixture of both proteins were investigated using the SDS polyacrylamid gel electrophoresis method.

The following results were obtained.

- 1) In the electrophoretic patterns of the water soluble fraction from chicken sample, seven distinct bands were observed in the unheated sample, but most of these bands

disappeared after heating until 70°C. In the case of salt soluble fraction from this sample, from nine to ten bands were observed which represented a typical pattern of myofibril protein, but these bands decreased to one or two by heating until 100°C.

2) In the electrophoretic patterns of the water soluble fraction from soybean sample, four main bands were observed before heating but two slower-moving bands decreased in intensity when heated at 70°C and the fastest moving band decreased remarkably its intensity when heated at 100°C. The electrophoretic patterns of the salt soluble fraction were similar to those of the water soluble fraction on heating of this sample.

3) When chicken and soybean protein were heated, the denaturated protein components that disappeared from the water soluble and salt soluble fraction were naturally found in the insoluble fraction.

4) When the mixture of chicken protein and soybean protein was heated and the electrophoretic patterns of this heated sample were compared with those of samples heated separately, no significant differences for the changes of protein in those samples were obtained under two heat treatments.