

## 蛋白質—多糖類ハイブリッド化による 新機能性食品素材の開発

加藤 昭夫 (山口大学農学部農芸化学科助教授)

### 1. はじめに

本研究者は食品蛋白資源の高度利用を図るため、新しいタイプの機能性蛋白質の開発研究を行ってきた。食品蛋白質を改変する手段として、多くの研究者は低分子物質を化学的・酵素的に蛋白質に結合させる方法を探ってきたが、我々は多糖類のような高分子物質を蛋白質に結合させ、新規な機能発現を試み、食品素材としての有効性を検討してきた。

種々の多糖類、蛋白質を用いて化学的に両者を共有結合させた“ハイブリッド”の中で、デキストラン—蛋白質ハイブリッドが市販の低分子系の乳化剤に匹敵する優れた乳化特性を示し、低 pH 下や高塩度下では市販の乳化剤より優れた乳化特性を示すことを報告した<sup>1)</sup>。

さらに、最近、化学試薬を一切使わないで自然界で生じるアミノカルボニル反応を利用し、同様に乳化特性の優れた蛋白質デキストランハイブリッドの作成に成功した<sup>2)</sup>。

こうした乳化特性以外にも蛋白質に多糖類を結合させると、その溶解性、耐熱性、構造安定性が増加するなど、蛋白質だけではみられない新しい機能の発現が期待される。とりわけ、多糖と蛋白質のハイブリッド化が、安全な手法で可能であるので、現在使用されている化学合成された乳化剤、防腐剤、抗酸化剤などに代る安全な食品添加物の開発の可能性を秘めている。

ここでは、本研究者が最も興味をもち、この一年間集中して研究してきたリゾチーム—デキス

トランハイブリッドの特徴について述べたい。他の蛋白質—多糖類ハイブリッドの性質については前述した文献の外にも報告しているので参照して頂きたい<sup>3,4)</sup>。

### 2. 方法

リゾチーム—デキストランハイブリッドの作成は等モルのリゾチームとデキストラン (分子量 6 万～9 万) の乾燥粉末を相対湿度 79% (飽和 KBr 溶液を含んだデシケーター内) で 60°C で 0～3 週間インキュベートした。こうして調製したリゾチーム—デキストランハイブリッドはセファクリル S-300 カラム (85×1.6cm) により精製された。

リゾチーム活性の測定は *M. lysodeikticus* の溶菌活性とグリコールキチンの糖結合の水解活性を用いて行った。

乳化剤の測定は Pearce と Kinsella の濁度法により行った。

リゾチーム—デキストランハイブリッドのグラム陰性菌に対する抗菌性は *V. parahaemolyticus*, *E. coli*, *A. hydrophila*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* を用いて調べた。

### 3. 結果を考察

Fig.1 はリゾチームとデキストランの混合物を 0, 1, 2, 3 週間、相対湿度 79%, 60°C でインキュベートしたもののセファクリル S-300 カラムによるゲル濾過パターンを示している。インキュベーションに伴い、蛋白質 (リゾチーム) のピークが高分子化してゆく様子が示されてる。この高分

子ピークを集めて、以下の実験の試料とした。

このハイブリッドの分子量を低角レーザー光散乱法で測定したところ、150,000~200,000であった<sup>5)</sup>。また、リゾチームのアミノ基が2個だけ減少し、デキストランの還元末端基とアミノ基を介して結合していることが示された<sup>5)</sup>。これらの結

果より、Fig.2に示すような結合様式のモデルが提案される。リゾチーム1分子にデキストランが2分子結合することが予想される。興味あることに、インキュベートが長くなっても、これ以上のデキストランが結合せずに、安定なハイブリッドを保っている。これは、高分子同士のアミノカル

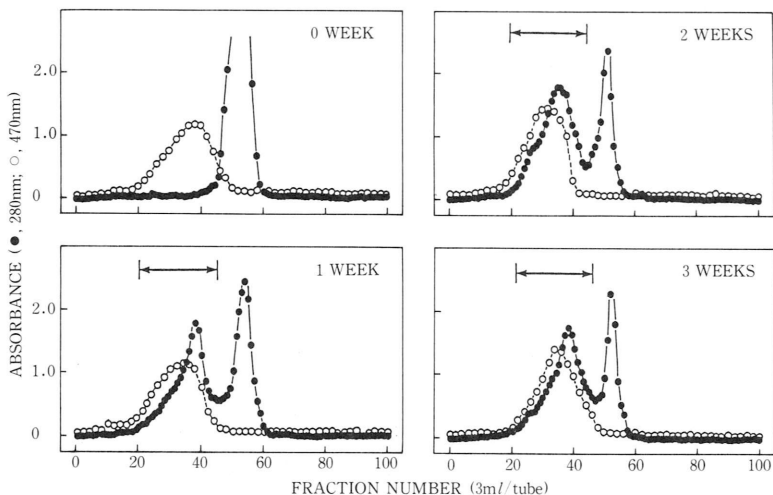
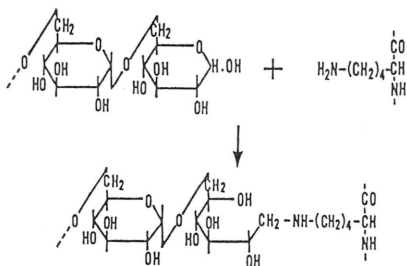


Fig. 1 Elution Profiles in 50 mM Acetate Buffer (pH5.0) on a Sephacryl S-300 Column on the Lysozyme-Dextran Mixtures Incubated at 60°C for 0-3 Weeks under 78.9% Relative Humidity Condition. The fractions indicated by horizontal arrows were pooled, dialyzed and used for further experiments. ●—●, absorbance at 280nm for protein; ○—○, absorbance at 470nm to follow the color development by the phenol-sulfate method for polysaccharide.

A) Maillard Reaction



B) Binding Mode

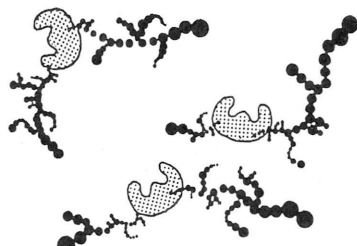


Fig. 2 Scheme for the Binding Reaction (A) and the Binding Mode (B) of Lysozyme-Dextran Conjugate through Maillard Reaction. Dotted areas in B indicate lysozyme whereas the branched solids circles indicate dextran.

ポニル反応が立体障害により、限定的に行われることを示している。褐変反応は極めて少ないことも間接的にこのことを支持している。

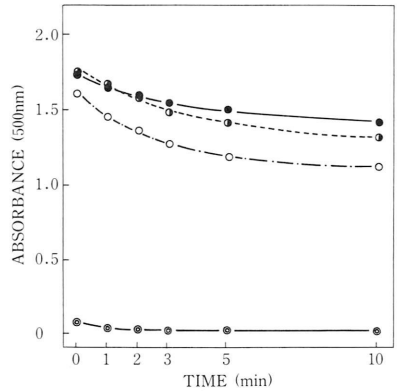
**Table 1** はこのリゾチーム-デキストランハイブリッドの活性を示している。溶菌活性はかなり低下したが、グリコールキチンを基質として用いた糖結合の水解活性は充分に残存しており、蛋白質の構造変化は少ないと予想される。

**Fig. 3** はリゾチーム-デキストランハイブリッドの乳化性を示している<sup>5)</sup>。縦軸はコーンオイル (1 ml) と試料溶液 (3 ml) を 1 分間、12,000 回転でホモジナイズして作成したエマルジョンの 50 倍希釈液の濁度を示し、横軸はエマルジョン形成後の放置時間を示す。リゾチームとデキストランの混合物は、ほとんど乳化能を示さないが、ハイブリッド化により、著しく高い乳化性が示され、2 週間インキュベーションしたものが最も優れた乳化安定性を示した。これまでに、オポアルブミン、大豆蛋白質、小麦蛋白質などを用いて、デキストランとハイブリッド化させているがこれらの中でリゾチーム-デキストランハイブリッドが最も優れた乳化性を示す。

リゾチームはグラム陽性菌に対して溶菌作用を示すが、グラム陰性菌に対しては作用しない。これはグラム陰性菌の外膜のリポポリサッカライド (LPS) により細胞壁の多糖類ペプチドグリカンが保護されているためである。したがって、リゾチーム-デキストランハイブリッドのように乳化能力の高いものはグラム陰性菌の外膜を不安定化したり、破壊する可能性がある。このような観点か

**Table 1** Enzymatic Activity of Native Lysozyme and Lysozyme-Dextran Conjugate

Lysozyme	Substrate	
	Glycol chitin	M. lysodeikticus
Native	100.0%	100.0%
Conjugate	79.8%	13.3%



**Fig. 3** Emulsifying properties in 1/5 M Phosphate Buffer (pH 7.4) of Lysozyme-Dextran Conjugate Purified by Gel Filtration. ○····○, 1 week incubated Conjugate; ●····●, 2 weeks incubated Conjugate; ⊙····⊙, 3 weeks incubated Conjugate; ⊕—⊕, native lysozyme+dextran.

ら、5 種類の食中毒菌を含むグラム陰性菌に対するリゾチーム-デキストランハイブリッドの効果を検討した (Fig. 4)<sup>6)</sup>。縦軸は生存率の log を示し、横軸は 50°C での加熱時間を示している。リゾチームやリゾチーム-デキストランハイブリッドを蛋白濃度が 0.05% になるように各微生物懸濁液に加えたものはいずれも未添加に比べ著しく生存率は低下し、リゾチーム-デキストランハイブリッドは *K. Pneumoniae* を除き、20 分で完全に死滅させることが示された。この結果はリゾチームをデキストランとハイブリッド化することにより、グラム陰性菌に対する感受性が高まったことを示しており、リゾチームの溶菌スペクトラムが拡大したことを示している。

食中毒菌はグラム陰性菌のものが多く、したがって、リゾチーム-デキストランハイブリッドは新規な食用防腐剤、静菌剤として、利用できる可能性を秘めている。

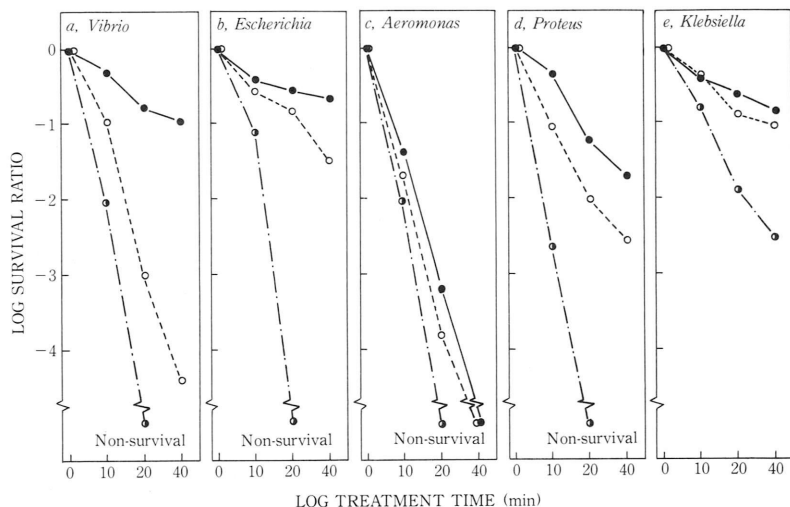


Fig. 4 Antimicrobial Activity of Lysozyme-Dextran Conjugate for 5 Laboratory Cultured Gram-Negative Bacteria.  $10^5$  cells/ml of tested cell suspension were exposed with native lysozyme and lysozyme-dextran Conjugate, and were immediately heat-treated at  $50^{\circ}\text{C}$ . Survival ratio was calculated from the bacterial number for a given treated time to the initial number. a, *Vibrio parahaemolyticus* IFO 13286; b, *Escherichia coli* IFO 12713; c, *Aeromonas hydrophila* IFO 13286; d, *Proteus mirabilis* IFO 12668; e, *Klebsiella pneumoniae* IFO 14438. ●—●, control; ○····○, native lysozyme; ●—●····●, lysozymedextran Conjugate.

以上、我々の開発した天然に生ずるアミノカルボニル反応を利用して蛋白質-多糖類ハイブリッドを作成すると、(1)乳化能力の高いハイブリッドができること、(2)リゾチームのような溶菌作用をもつ蛋白質とデキストランをハイブリッド化することによって、新規な抗菌作用を示すものに変換できること、(3)ここでは示さなかったが難溶性の食品蛋白質をプロテアーゼで可溶化した後、ハイブリッド化により高分子化し、苦味のないものに再構成できること、(4)蛋白質の安定性を高めること、などが現在までに我々の研究室で明らかにされている。こうした蛋白質-多糖類ハイブリッドは目的に応じて、蛋白質、多糖類の組合せを変えることによって、さらに新規な機能をもつハイブリッドができると思われる。

#### 4. おわりに

本研究対して、研究助成金を交付して頂いた、浦上食品・食文化振興財団に対し、感謝いたします。

#### 文献

- 1) A. Kato, K. Murata and K. Kobayashi, *J. Agric. Food Chem.*, 36, 421-425 (1988).
- 2) A. Kato, Y. Sasaki, R. Furuta and K. Kobayashi, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 107-112 (1990).
- 3) 加藤昭夫, “タンパク質ハイブリッド第三巻” 共立出版株式会社 1990, p.265-276
- 4) 加藤昭夫, 小林邦彦, 化学と生物, vol.28, No. 5, 285-287 (1990).
- 5) S. Nakamura, A. Kato, and K. Kobayashi, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 投稿中
- 6) S. Nakamura, A. Kato, and K. Kobayashi, *Agric. Biol. Chem.*, 54, No. 11, 印刷中 (1990)

Novel functional properties of protein by conjugation  
with polysaccharide.

Akio Kato (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of  
Agriculture, Yamaguchi University)

Lysozyme-dextran conjugate was effectively prepared by incubating at 60°C for 2 weeks under 78.9% relative humidity in the lyophilized state. Estimating from the binding weight ratio, about two molar dextrans were covalently linked with one molar lysozyme. Lytic activity of the conjugate was considerably reduced when measured using *Micrococcus lysodeikticus* as a substrate, while it still remained about 80% of native lysozyme when measured using glycol chitin. The heat stability of the activity of lysozyme was increased by linking with dextran. The emulsifying properties of the conjugate were much higher than native lysozyme. The lysozyme-dextran conjugate revealed a strong antimicrobial activity for Gram-negative bacteria by combining with heat-treatment at 50°C.