

分離大豆たん白質からの 水解物製品の精製

PREPARATION AND SOME CHARACTERISTICS OF SOY PROTEIN FROM RAW SOY BEAN AND SOY PROTEIN ISOLATE

金森正雄・土井裕司（京都府立大学農学部）

Masao KANAMORI and Yuuji DOI

Department of Agricultural Chemistry, Kyoto Prefectural University

ABSTRACT

Proteins from raw soybean or Fujipro R were fractionated by Sephacryl S-200 gel filtration with phosphate buffer, pH7.6 ($I=0.5$), to six fractions (R-I to R-VI or F-I to F-VI). F-I, F-II and F-IV corresponded to 11 S, 7 S and 2 S proteins, respectively. Trypsin inhibitory activity of the extract from Fujipro R was lost by pepsin treatment, while that from raw soybean was maintained. Proteins from Fujipro R were stable to heating. Half amount of each fraction precipitated by calcium ion, but bovine k -casein prevents from precipitating.

分離大豆たん白質を用いたラットによる従来の栄養試験では必ずしも良好な結果が得られていない。しかしながら一般に大豆および大豆製品の第一制限アミノ酸であるメチオニンなど含硫アミノ酸およびこれに次ぐ制限アミノ酸としてのスレオニン、さらにはリジンなどを考慮して適当に添加することによって、改善された大豆たん白質の栄養価は幼若、成熟ラットにより違いはあるが全卵たん白質に匹敵するほど向上することが多くの研究者¹⁾によって報告されている。

著者は脱脂大豆粉、生大豆、フジプロR、フジニックエース100等について、それぞれを各種たん白分解酵素ならびに塩酸を用いて加水分解し得られた水解物の栄養試験を行う目的で実験を行っている。試料調製および分析が未完であり、動物実験も目下進行中であるので、今回は生大豆、フジプロRの組成たん白質相互の諸性質ならびに Ca^{++} 、牛乳 κ -カゼインとこれら組成たん白質との相互作用について精査した結果について以下報告する。

〔実験1〕

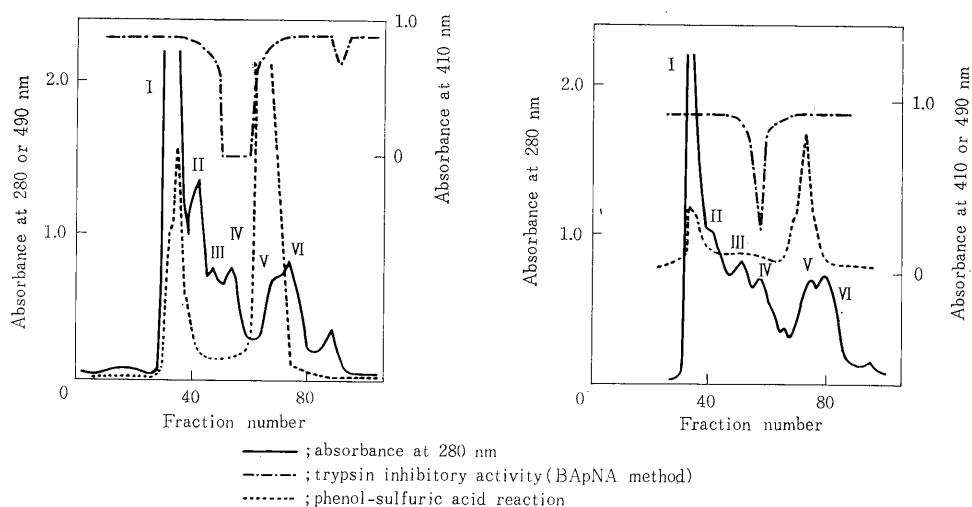
フジプロRおよび生大豆を用いて Table 1 に示したように越山²⁾、柴崎³⁾、渡辺⁴⁾らの方法に準拠してたん白

の抽出分離を行った。ゲル濾過支持体としてあらたに、Sephacryl S-200, S-300 を用いゲル濾過クロマトによって、それぞれからたん白を分画し各6成分たん白を分画した。すなわち4g 試料を用い、pH 7.6、イオン強度0.5、0.4 M NaCl を含むリン酸ソーダ緩衝液を用いて、4℃、72時間抽出し、28,000rpm 1時間遠心分離した。得られた上澄液について、280nm の吸収、およびたん白濃度を調べたところ、フジプロRおよび生大豆についてそれぞれ、0.65×50, 1.015×50, および15.4mg/ml, 34.2mg/ml の値が得られた。この抽出上澄液を用いて Sephacryl S-200カラムクロマトを行った。カラム(4×93cm), flow rate 110ml/hr, 12ml 宛分取し、各分取フラクションについて、280nm 吸収、フェノール硫酸法による糖含量、トリプシン阻害活性の有無について調べた。その gel filtration のパターンを Fig. 1 に示した。280nmの吸収からI～VIの画分の存在が確認され、Iは11S、IIは7S、III、IVは2Sに相当する画分と思われる、アミノ酸の分析値および電気泳動によるたん白染色状況などからV、VI画分は低分子(分子量5,000以下)の糖を含む酸性のペプチドであることが推定される。

Table 1. Fractionation of proteins from raw soybean and Fujipro R.

4 g of raw soybean Flour or Fujipro R		
40 ml of buffer $^{\circ}\text{C}^{**}$		
stirred for 72 hr at 4 $^{\circ}\text{C}$		
centrifuged at 28,000 rpm for 1 hr		
ppt	supernatant*	
	Sephacryl S-200 column	
R-I F-I	R-II F-II	R-III F-III
		R-IV F-IV
		R-V F-V
		R-VI F-VI
Soybean flour Fujipro R		
*; Absorbance at 280 nm	1.015 x 50	0.65 x 50
Protein concentration	34.2 mg/ml	15.4 mg/ml
Amount of extract	28 ml	28 ml

**; Sodium phosphate buffer, pH 7.6,
containing 0.4 M NaCl (Ionic strength = 0.5)



28 ml of extract was applied on a column (4 × 93 cm).
Flow rate was 110 ml/hr. One tube contained 12 ml.

Fig. 1 Sephacryl S-200 gel chromatography of extracts from raw soybean flour and Fujipro R.

トリプシン阻害活性測定には α -N-ベンズイル-D, L-アルギニン-p-ニトロアニリド (BANA) を用いた Erlanger 法⁵⁾ を modify した著者ら⁶⁾ の方法を用いて調べた。トリプシン阻害活性はIV画分にのみみられた。すなわちフジプロR, 生大豆ともに, このIV成分たん白で2Sたん白画分と考えられる部分にのみ阻害活性の存在が確認された。たん白化学的には, 大豆の2Sグロブリンたん白は, 貯蔵たん白で生理活性を持たぬたん白であると現在まで信じられていたが, 最近の新しい報告⁷⁾

によるとトリプシンおよびキモトリプシン阻害活性がこの2Sグロブリン画分に存在することが明らかとなり, しかも α_2 , α_3 , α_4 成分といった分子量32,500, 21,900, 27,800と異なる複数成分たん白から成ること, また日本種, 外国種の間にはこれらの成分含量に差があることが認められた。 α_3 , α_4 は Kunitz trypsin inhibitor に相当するものであろうと報告されているが, 著者の実験からもこの事実は肯定できる。

得られた分画 F-I を Sephacryl S-300 で, F-II, III,

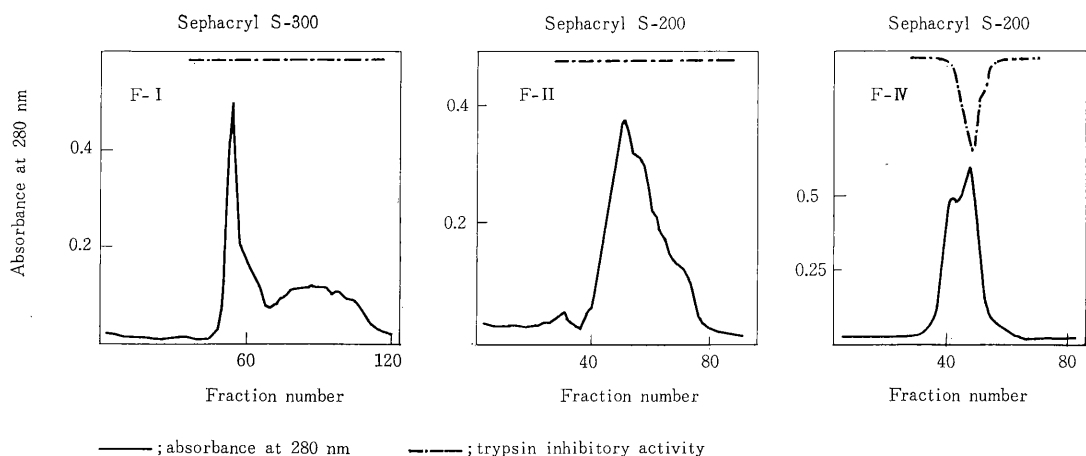


Fig. 2 Rechromatographies of proteins F-I, F-II and F-IV on Sephacryl column.

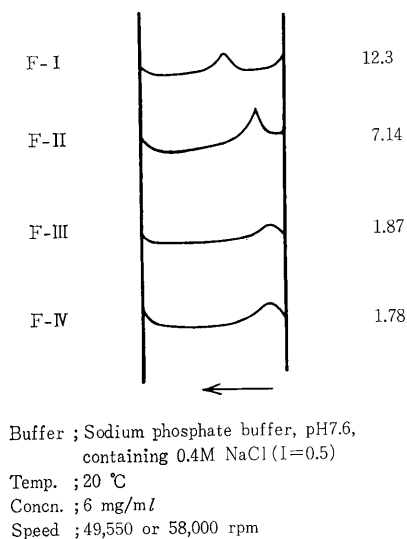


Fig. 3 Sedimentation patterns of proteins F-I, F-II, F-III and F-IV.

IVを Sephacryl S-200 で再クロマトし、同時にトリプシン阻害活性を追跡調査した結果を Fig. 2 に示した。再クロマトした F-I, II, IV について、それぞれ高いピークのみを分取して、pH 7.6, イオン強度 0.5, 0.4M NaCl を含むリン酸ソーダ緩衝液を用いて、20℃, たん白濃度 6mg/ml で 49,550 および 58,000rpm で超遠心をかけ、Fig. 3 に示した超遠心パターンが得られた。これから各成分たん白の沈降恒数を求めたところ F-I, II, III および IV について、それぞれ 12.3 S, 7.14 S, 1.84 S, 1.78 S の値が得られ、それぞれ超遠心的には単一の純粋たん白であった。この結果から 11 S, 7 S, 2 S 相当のたん白画分であることがわかった。

F-I ~ IV について、pH 8.9, 7.5% ポリアクリルア

ミド分離ゲルを用いて Davis 法⁹⁾により disc 電気泳動を行ったところ Fig. 4 に示す結果が得られたが、結果からわかるように、この条件では gel を通過し得ず思わしい結果ではなかった。

次いで pH 7.2, 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて Weha and Osborn 法⁹⁾に従って SDS 電気泳動法を行った。その結果は Fig. 5 のとおりであり、各分画について数成分が確認された。F-II では F-I より低分子の成分がみられ、F-IV ではフジプロ R と生大豆とは異なった成分構成がみられた。フジプロ R では加熱等の処理による成分の出現がみられている。

次に、各抽出液について ペプシン：たん白質=1:50 (W/W), たん白質濃度 2mg/ml, 37℃ pH 1.6 でペプシン消化を行い、incubate したのち pH 7.6 として Sephacryl S-200 でのゲル透過を行って成分たん白の変化をみたところ Fig. 6 に示す結果が得られた。生大豆の場合は3時間の消化後も約70%のトリプシン阻害活性が残存したが、フジプロ R の場合には1時間後にはトリプシン阻害活性は認められなかった。

各画分のペプシンに対する susceptibility を TNBS 法¹⁰⁾を用い、アミノ基の出現で測定した結果は Fig. 7 のとおりであった。すなわち Fraction I ~ IV (2mg/0.9ml 0.1N HCl) にペプシン (0.04mg/0.1ml 0.1N HCl, pH 1.38) を加え 37℃, 0~60分 incubate し 4% NaHCO₃ (pH 8.89) 1ml を加え、さらに 0.1% TNBS 1ml を加え、37℃, 2時間 incubate して 5% SDS 1ml, 1N HCl 1ml を加えて 340nm で吸収を測定した。この結果から Fraction I ~ III 成分たん白は5分でかなり消化、加水分解される結果が得られ、IV画分のみ多少時間がかかって消化されることがわかった。

以上 Fraction I ~ IV 成分たん白についての諸性質を検討した。前述のとおり目下脱脂大豆粉、生大豆、フジ

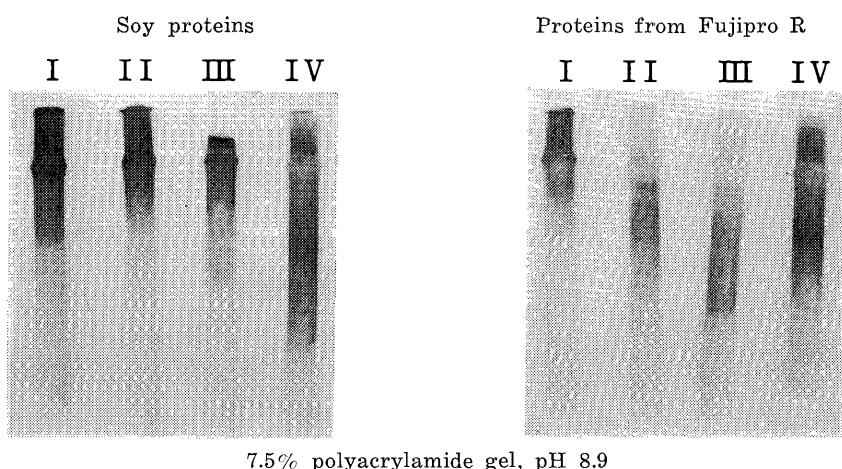


Fig. 4 Disc gel electrophoreses containing 0.5 M NaCl of soy proteins and proteins from Fujipro R

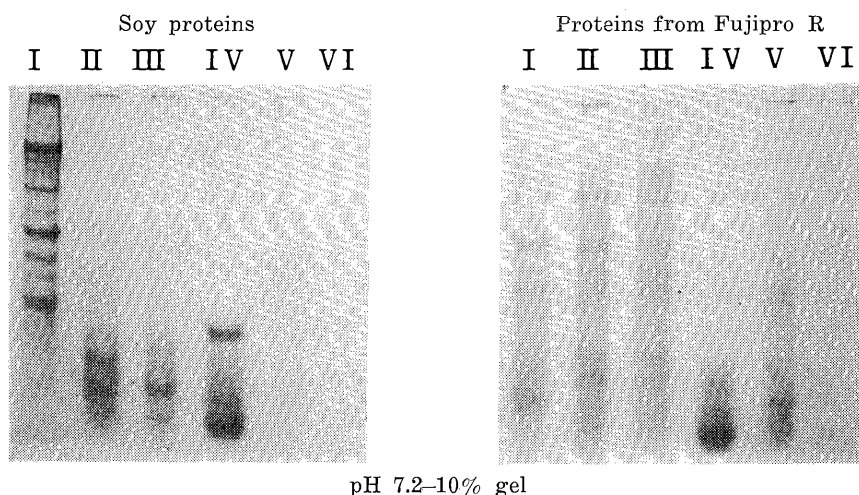


Fig. 5 SDS-polyacrylamide gel electrophoreses of soy proteins and proteins from Fujipro R

プロ R, フジニックエース 100 について、ペプシンおよび他のたん白分解酵素を用いて分解した試料および HCl 分解試料についてそれぞれの成分組成分析ならびに動物実験を進行中で、最終結果が得られ次第報告する。

〔実験 II〕

前〔実験 I〕で分別した各成分たん白に対する Ca^{++} による沈殿性ならびに牛乳 κ -カゼインとの複合体形成等に関する実験結果を報告する。

試料各 2.5mg/ml 10mM イミダゾール 70mM KCl 緩衝液, pH 7.1, 同じイミダゾール緩衝液にとかした 200mM CaCl_2 0.1ml を添加し, 37℃ および 80℃, 20分 incubate したのち, 2,000rpm で 1分遠沈する。上澄液を 50mM クエン酸カリで 5 倍希釈して 280nm で吸収を測定する方法で沈殿率をみた。その結果は Table 2 の

とおりであり, 37℃, 80℃ での影響は殆んどなかったが, Ca^{++} 存在下で κ -カゼインを加えて 37℃, 80℃ での影響を調べたところ κ -カゼインの存在で Ca^{++} に対する沈殿率はぐんと減少した。 κ -カゼインとの相互作用は加工利用の上で価値ある現象ではなからうかと思ひ粘度等物性的変化について精査しているが Fig. 8 に示すように, κ -カゼインと各成分たん白とは複合体を形成していることが認められた。

文 献

- 1) Castro, C.E., Young, S.P. and Harden, M. L. (1976): Supplemental value of liquid cyclone processed cottonseed flour on the proteins of soybean products and cereals.

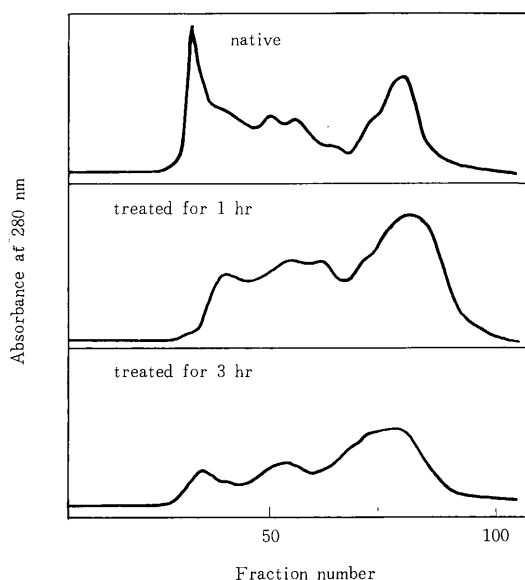


Fig. 6 Sephacryl S-200 gel chromatography of extract from Fujipro R treated with pepsin.

Reaction conditions:

pepsin: protein = 1 : 50 (w/w)

protein concn. = 2 mg/ml

temperature; 37°C

pH; 1.6

Trypsin inhibitory activity was lost by the treatment with pepsin.

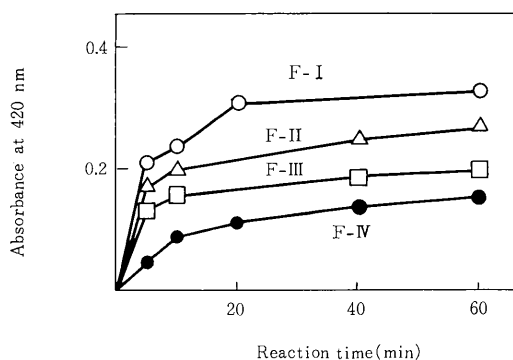


Fig. 8 Hydrolysis of proteins from Fujipro R by pepsin.

Reaction was followed by measurement of amino group with TNBS.

Reaction conditions:

protein concn.; 2 mg/ml

protein: pepsin = 50 : 1 (w/w)

temp.; 37°C

pH; 1.6

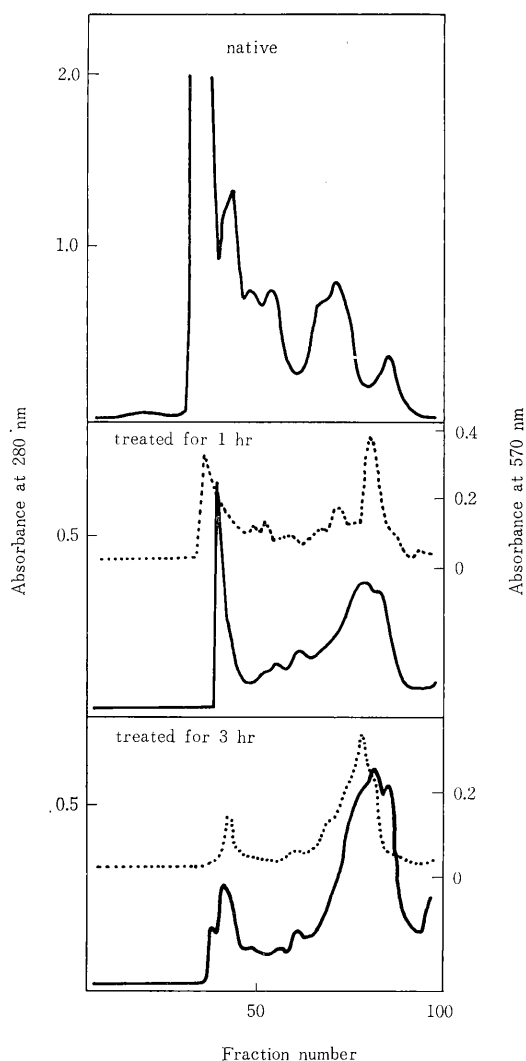


Fig. 7 Sephacryl S-200 gel chromatography of extract from raw soybean flour treated with pepsin.

Cereal Chem., **53**, 291-298.

- 山口迪夫, 岩谷昌子, 宮崎基嘉 (1980): 分離大豆たん白質の制限アミノ酸とその補足効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **1**, 10-15.
- 井上五郎, 岸恭一, 八木郁子 (1980): 分離大豆たん白質へのメチオニン補足量に関する研究. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **1**, 6-9.

- 2) Koshiyama, I. (1972): Purification and physico-chemical properties of 11 S globulin in soybean seeds. *Int. J. Peptide Res.*, **4**, 167-176.

Koshiyama, I. (1972): A newer method for isolation of the 7S globulin. *Agric.*

Table 2. Solubilization of heated proteins from Fujipro R by bovine κ -casein in the presence of calcium ion.

Sample	F-I	F-II	F-III	F-IV	F-V	F-VI
κ -Cn free	58.9	48.8	39.8	33.7	51.5	37.9
κ -Casein	5.3	22.3	23.0	19.1	75.1	70.0

Conditions: soy protein concn. = 2.5 mg/ml

κ -casein concn. = 1 mg/ml

calcium ion concn. 20 mM

heating; 80°C, 20 min.

buffer; 10 mM imidazole-70 mM KCl, pH 7.1

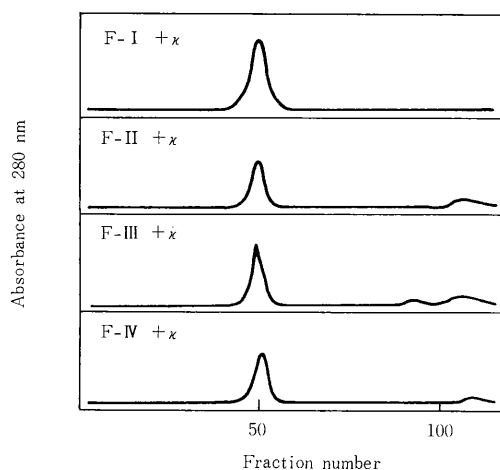


Fig. 9 Complex formation of proteins from Fuji-Pro R with bovine κ -casein

Complex formation:

soy protein κ -casein = 5 : 2

soy protein concn.; 2.5 mg/ml

heating; 80°C, 20 min.

Elution:

potassium phosphate buffer, pH7.6,
containing 0.4M. NaCl and 4.5M
urea.

Biol. Chem., **36**, 2255-2257.

- 3) Thanh, V.H. and Shibasaki, K. (1976): Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1117-1121.
- 4) Hashizume, K. and Watanabe, T. (1979): Influence of heating temperature on conformational changes of soybean proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 683-690.

- 5) Erlanger, B.F., Kokowsky, N. and Cohen, W. (1961): The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271-278.
- 6) Kanamori, M., Ibuki, F., Tashiro, M., Yamada, M. and Miyoshi, M. (1975): Occurrence of a trypsin inhibitor in eggplant exocarps. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 421-428.
- 7) Koshiyama, I., Kikuchi, M., Harada, K. and Fukushima, D. (1981): 2S globulins of soybean seeds. 1. Isolation and characterization of protein components. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 336-340.
Koshiyama, I., Kikuchi, M. and Fukushima, D. (1981): 2S globulins of soybean seeds. 2. Physicochemical and biological properties of protease inhibitors in 2S globulins. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 341-343.
- 8) Dairs, B.J. (1964): Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
- 9) Weber, K. and Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.
- 10) Okuyama, T. and Satake, K. (1960): On the preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenylamino acid and -peptides. *J. Biochem.*, **47**, 454-466.