

# 酸性域で機能特性をもつ 高度リン酸化大豆たん白質の開発

FUNCTION OF A HIGHLY PHOSPHORYLATED SOYBEAN PROTEIN  
AT THE ACIDIC RANGE

鬼頭 誠<sup>1)</sup>・広塚元彦<sup>2)</sup>・谷口 等<sup>2)</sup>・成田宏史<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>京都大学食糧科学研究所, <sup>2)</sup>不二製油研究所

Makoto KITO and Hiroshi NARITA<sup>1)</sup>

Motohiko HIROTSUKA and Hitoshi TANIGUCHI<sup>2)</sup>

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611<sup>1)</sup>

Fuji Oil Company, Izumi-Sano, 598<sup>2)</sup>

## ABSTRACT

Acid precipitated soybean protein (Soybean Protein Isolate, SPI) was phosphorylated with  $\text{POCl}_3$  under an alkaline condition. The amount of incorporated phosphorus was  $14 \mu\text{g}$  per mg of SPI. When the molecular weight of the SPI was taken as 360,000 daltons, the mol ratio of phosphorus to protein was about 140. Amino acid analysis for the phosphorylated SPI suggested that the type of phosphate bound to the protein was ortho-phosphoric acid, and that the phosphorylated amino acid residues were lysine and histidine. The association of phosphate to SPI was stable for more than 2 weeks at  $\text{pH} > 5.0$ . The functions of phosphorylated SPI were examined at various pH. The high solubility of phosphorylated SPI at  $\text{pH} > 3.0$  did not decrease the emulsifying ability and gel forming ability, even in the acidic range when compared with the neutral range, whereas the SPI lost most solubility and functionality at  $\text{pH} < 5.5$ . There was no difference between the digestibility of phosphorylated SPI and SPI. These results suggested that phosphorylated SPI is a very useful food material possessing good functional properties throughout a wide pH range.

SPIは良好な食品機能を備え、たん白質素材として多様な食品に使用されている。しかし酸性域ではその機能発現が抑制されている。これは等電点が  $\text{pH} 4.5$  であるために、溶解性が低下することに起因している。

本研究では、SPIを高度リン酸化することにより、ネットチャージを変化させ、SPIの等電点をさらに低くすること、および得られた高度リン酸化SPIの機能特性や消化性を検討することを目的とした。

## 実験方法

### 1. SPIの調整

脱脂大豆粉に12倍量の温水 ( $50^\circ\text{C}$ ) を加え、 $\text{pH} 7.5$  に調整して1時間攪拌した。ついで、 $3,000 \times \text{g}$ 、10分間の遠心で得られた上澄を  $1 \text{ N HCl}$  で  $\text{pH} 4.5$  に調整し、

生じた沈殿を遠心分離して得た後10倍量の水で洗浄し、 $5 \text{ N NaOH}$  で溶解しSPI溶液とした。mg mg

### 2. SPIのリン酸化

SPIのリン酸化は、 $\text{POCl}_3$  を *n*-ヘキサンに溶解し4% SPI溶液に  $\text{pH} 10 \sim 11$  の条件下で徐々に加えることにより行った。反応は30分間で終了した。ついで *n*-ヘキサン層を分離除去後、反応液を透析またはゲル透過することによりリン酸化SPIを得た。

## 結 果

### 1. リン酸化SPI

上述の方法で得たリン酸化SPIは、 $\text{POCl}_3/\text{SPI}$  比を増加させることにより多量のリン酸を結合することができた。Table 1に示すように、両者のモル比が1000で

Table 1. Effect of  $\text{POCl}_3$  : SPI ratio on the extent of SPI phosphorylation

$\text{POCl}_3$ : SPI (mol/mol)	Phosphorus in SPI	
	Pi/SPI ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Incorporation (mol/mol)
0	1.5	
50	2.0	5.8
200	2.8	15.1
500	9.8	96.3
1000	14.3	150.8
2000	14.8	154.3
3000	14.1	146.2

The concentration of SPI was constant (4%) and the amount of  $\text{POCl}_3$  was varied.

プラトーに達した。この時14 $\mu\text{g}$ のリン酸が1mgのSPIにとり込まれた。リン酸化はpH 8～11の間で進行したが、pHが高くなる程よくとり込まれた (Table 2)。したがって、リン酸化はpH 11で  $\text{POCl}_3$ /SPI 比1000で行うことを標準条件とした。なお、とり込まれたリン酸はすべてオルトリン酸であることを確認した。

## 2. リン酸結合の安定性

リン酸化 SPI におけるリン酸結合の安定性を種々の pH で調べた (Table 3)。ほとんどの pH 領域で安定であったが、pH 2.5以下では非常に不安定であることが示された。

## 3. リン酸化 SPI の溶解性

リン酸含量が高まるにつれて酸性域での溶解性が高まった (Fig. 1)。1 モル SPI 当たり100モルのリン酸が結合したものは、本来の等電点である pH 4.5で沈殿しなかった。さらに増加して150モルリン酸/モル SPI となると pH 3.5でも溶解した。しかし15モル程度では広範囲の pH 域で沈殿した。

## 4. 乳化活性

pH 4.5～5.5の範囲で、リン酸化 SPI はリン酸量が増すにつれて高い乳化活性 (EA) を示したが、SPI そのものは無効であった (Table 4)。高度にリン酸化された SPI は酸性域でも中性域と同程度の活性を示した。

Table 2. Effect of reaction pH level on the extent of SPI phosphorylation

Incorporation (Pi/SPI)	Reaction pH			
	8.0	9.0	10.0	11.0
$\mu\text{g}/\text{mg}$	8.9	10.5	12.6	12.3
mol/mol	103.2	121.8	146.1	142.6

The ratio of  $\text{POCl}_3$ /SPI in the reaction mixture was 1500 (mol/mol). The pH was adjusted with 5N-NaOH.

Table 3. Stability of bound phosphate

pH	Dialysis (day)	Incorporation ( $\mu\text{g}$ Pi/mg SPI)
11.0	0	14.8
	1	15.0
	3	14.0
	5	14.0
	7	14.0
7.5	14	14.0
	1	14.4
	3	13.9
	5	13.2
	7	12.2
5.0	14	12.8
	1	14.6
	3	13.8
	5	12.5
	7	9.9
	14	10.0
4.5	1	14.3
3.5	1	13.8
2.5	1	5.6
1.5	1	6.2

1% P-SPI solution was dialyzed against 10 mM tris-malate or  $\text{CH}_3\text{COONa-HCl}$  at 4°C for 14 days. The incorporated phosphorus was measured after dialysis.

## 5. カルシウムによる沈殿性

通常の SPI は  $\text{Ca}^{2+}$ によって沈殿する。しかし高度にリン酸化された SPI は  $\text{Ca}^{2+}$ 沈殿性に対して耐性となった (Fig. 2)。

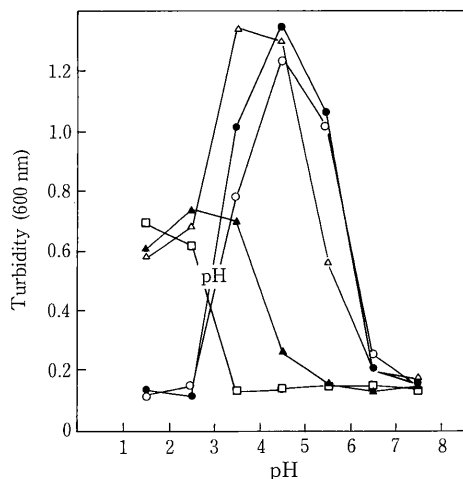


Fig. 1 Effect of pH on the turbidity of a P-SPI solution. The concentration of the samples was 0.1%. The contents of phosphorus (mol Pi/mol SPI) were as follows: 0, (○); 5.8, (●); 15.1, (△); 96.3, (▲); 150.8, (□).

Table 4. Effect of phosphorylation on the extent of relative emulsification activity

Pi/SPI (mol/mol)	EA (%) at different pH levels		
	4.5	5.5	6.5
0	0	0	100
5.8	0	41	98
15.1	56	90	103
96.3	122	114	130
150.8	125	118	130

## 6. ゲル形成性

凍結乾燥したリン酸化 SPI は未処理のものと同程度の溶解性を示した。通常の SPI は凍結乾燥によってゲル形成性を失うが、リン酸化 SPI のゲル強度はこのような処理によっても、pH4.5~6.5の間で変化しなかった (Fig. 3)。市販の熱風乾燥 SPI (フジプロ R) は pH5.5 ではかなり弱いゲル形成性を示したが、pH4.5 では無効であった。

## 7. リン酸化されたアミノ酸残基の種類

塩酸水解法で求めた SPI およびリン酸化 SPI のアミノ酸組成を Table 5 に示した。両者の組成は等しく、ホスホセリンなどは検出できなかった。

つぎにプロナーゼ E を用いる水解法で両者のアミノ酸組成を調べたところ、リン酸化 SPI のリジンおよびヒスチジン含量が SPI に比し少なかった (Table 6)。しかしセリン含量には差はみられなかった。リジン、ヒスチジンの回収率の低さは、これらのアミノ酸がリン酸化されたことによりプロナーゼ E の作用を受けにくくなったことに原因があると考えられる。この場合

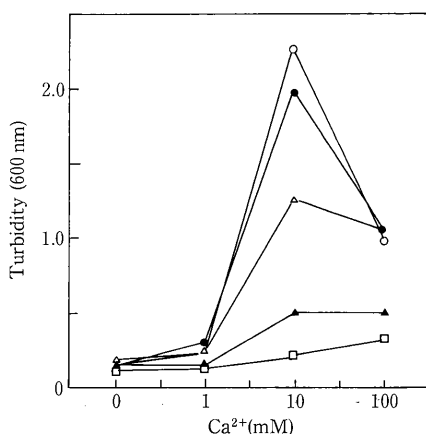


Fig. 2 Effect of calcium concentration on the turbidity of P-SPI solution.

The concentration of the samples was 0.1%. The contents of phosphorus (mol Pi/mol SPI) were as follows: 0, (○); 5.8, (●); 15.1, (△); 96.3, (▲); 150.8, (□).

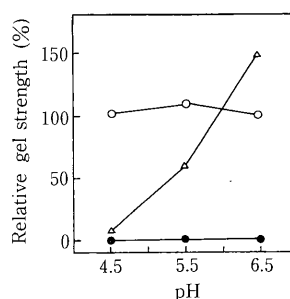


Fig. 3 Effect of pH on the relative gel strength of P-SPI.

The concentration of the samples was 12% in 2.5% NaCl. P-SPI, (○); control SPI, (●); commercial SPI (Fujipro R), (△).

未水解の残基はオリゴペプチド中に残っていると推測された。そこで、セファデックス G-10 カラムでプロナーゼ E 生成物の分画を行い、オリゴペプチドフラクションを得た後 (Fig. 4), 塩酸水解してアミノ酸分析を行った (Table 7)。リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸が主要な構成アミノ酸であった。またリン酸はこのフラクションにのみ存在した。アルカリ性ではグルタミン酸やアスパラギン酸の  $\omega$ -カルボキシル基と  $\text{POCl}_3$  との反応は困難であると考えられるので、オリゴペプチドフラクションはプロナーゼ E によって切断されないリン酸化リジンおよびヒスチジンを含んでいることが示された。

Table 5. Amino acid composition of SPI and P-SPI hydrolyzed by HCl

Amino acid	SPI	P-SPI	P-SPI/SPI
	(mmol/100 g SPI)	(mmol/100 g P-SPI)	(%)
Lys	39.3	39.1	99.4
His	15.3	14.5	105.0
Arg	37.6	37.5	100.0
Asx	74.2	76.2	102.0
Thr	26.3	26.5	99.2
Ser	37.9	38.5	98.4
Glx	113.6	115.0	98.9
Gly	48.2	50.1	96.2
Ala	41.9	41.8	100.0
Val	36.6	37.2	98.4
Met	7.8	7.8	100.0
Ileu	32.2	32.7	98.5
Leu	51.3	51.3	100.0
Tyr	19.9	19.1	96.0
Phe	27.5	27.7	100.0

The hydrolysis was carried out in 6N-HCl at 110°C for 24 hr.

Table 6. Amino acid composition of SPI and P-SPI hydrolyzed by Pronase E

Amino acid	SPI	P-SPI	P-SPI/SPI
	(mmol/100 g SPI)	(mmol/100 g P-SPI)	(%)
Lys	27.7	9.3	33.5
His	11.2	6.3	56.3
Arg	17.0	18.6	109.4
Asp	5.8	5.7	100.0
Thr+Gln	26.0	26.3	100.0
Ser+Asn	90.5	93.4	103.2
Glu	13.2	14.4	109.2
Gly	5.0	5.2	101.0
Ala	22.9	16.6	72.5
Val	37.0	36.6	99.0
Met	7.8	7.8	100.0
Ileu	34.3	29.8	90.0
Leu	52.0	51.5	100.0
Tyr	20.0	14.9	74.5
Phe	28.0	26.3	93.9

The hydrolysis was carried out with Pronase E at 37°C, pH 7.0, for 6 hr.

## 8. リン酸化 SPI の消化性

SPI およびリン酸化 SPI を人工消化酵素系（ペプシン、パンクレアチン、アミノペプチダーゼ、プロリダーゼ）により水解したところ、アミノ酸組成は両者ともに等しかった (Table 8)。リジン、ヒスチジンの回収量は同じであった。この結果はプロナーゼ E 処理で得た結果と矛盾しているように思われる。しかし SPI に

Table 7. Amino acid composition of peptides in P-SPI hydrolyzed by Pronase E

Amino acid	Mole ratio of amino acids (%)		A/B
	Peptides in P-SPI (A)	Control SPI (B)	
Lys	11.7	6.1	1.90
His	2.8	2.3	1.20
Arg	2.8	6.1	0.46
Asx	15.9	12.4	1.29
Thr	4.6	4.3	1.07
Ser	6.7	6.3	1.06
Glx	25.8	18.7	1.38
Gly	5.5	8.0	0.69
Val	4.6	6.0	0.77
Met	0	1.0	0
Ileu	3.0	5.3	0.57
Leu	2.5	8.3	0.30
Tyr	1.2	3.1	0.39
Phe	1.4	4.5	0.34

The peptide fraction was collected by the gel filtration shown in Fig. 4. Fraction No. 24 was analyzed. The hydrolysis was carried out in 6N-HCl at 110°C for 24 hr. The control SPI (not hydrolyzed by Pronase E) was hydrolyzed by HCl in the same manner as the peptide fraction.

結合したリン酸は、前述したように pH 2.5 以下では極めて不安定である。ペプシン水解は pH 2.0 で行われたゆえに、結合リン酸は容易に切断されたものと考えられる。そしてリン酸化 SPI は容易に SPI の状態になりえたものと結論できる。

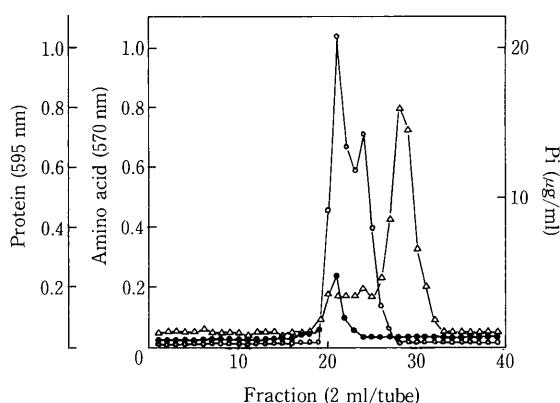


Fig. 4 Gel filtration profile of P-SPI hydrolyzed by Pronase E.

Gel filtration was carried out on a Sephadex G-10 column (2.0 cm × 40 cm). The flow rate was 1.0 ml/min and the eluting buffer was 10 mM CH<sub>3</sub>COONa-HCl (pH 6.0). Protein, (●); amino acid, (△); Pi, (○).

Table 8. Amino acid composition of SPI and phosphorylated SPI hydrolyzed by digestive enzymes

Amino acid	SPI	P-SPI	P-SPI/SPI
	(mmol/100 g SPI)	(mmol/100 g P-SPI)	(%)
Lys	30.6	30.8	100.0
His	10.2	10.7	99.4
Arg	27.7	27.1	104.8
Asp	27.7	27.1	104.8
Thr+Gln	26.3	26.2	100.0
Ser+Asn	38.1	37.9	99.5
Glu	49.5	51.0	103.0
Gly	36.2	34.9	96.4
Ala	38.8	39.8	102.6
Val	38.3	39.3	102.6
Met	7.7	8.0	103.0
Ileu	32.7	32.2	100.0
Leu	49.0	51.0	104.1
Tyr	17.9	17.0	95.0
Phe	26.5	27.3	103.0

The first hydrolysis was carried out with pepsin at 37°C, pH 2.0, for 3 hr; the second with pancreatin at 37°C, pH 7.5, for 20 hr; and the third with aminopeptidase and prolidase at 37°C, pH 7.5, for 24 hr.

## 考 察

リン酸化された SPI は興味ある機能性を示した。リン酸基のもつ負電荷により SPI のネットチャージはさらに負となり、pH 4.5 では沈殿しなくなった。そして pH 4.5 でもゲル形成性や乳化活性をもつようになった。このような新しい機能特性を賦与された SPI は酸性食品への広い用途をもっている。その上、Ca<sup>2+</sup> に対する低いレスポンスはカルシウム強化にも利用できる。

一方、リジンやヒスチジンに結合したリン酸基の結合は pH 3.5 以上で安定であった。リジンの  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 基がこのような形で保護されることにより、食品加工過程で生ずる褐変反応の防止が可能となる。なお強い酸性ではこの結合は非常に不安定となるので、ペプシン反応の至適 pH (2.0) ではリン酸は容易に SPI から遊離されるようになる。したがってリン酸化 SPI は SPI と同様な消化性をもつようになる。このような高度リン酸化 SPI は新しい食品素材として、広い pH 領域にわたって使用されうるものといえる。