

## 分離大豆たん白質の糖脂質成分

### SEPARATION OF GLYCOLIPID IN SOY PROTEIN ISOLATE

本間清一・三田知子・村田容常（お茶の水女子大学家政学部）

Seiichi HOMMA, Tomoko MITA and Masatsune MURATA

Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu University, Tokyo

112

#### ABSTRACT

Soy protein isolate (SPI) was fractionated by cryoprecipitation after dispersing in water and by isoelectric precipitation after dissolving in alkaline solution. Lipid in the fractions was extracted with 87% ethanol and lipid class was compared by TLC. The TLC profiles for glycolipid slightly differed and those for phospholipid differed significantly by fraction. SPI was extracted with 87% alcohol and chromatographed on a silicic acid column. The yield of lipid from SPI was 2%. The extracted lipid consisted of 10% of neutral lipid, 30% of glycolipid and 60% of phospholipid. Sugars in the glycolipid were mannose (35%), galactose (50%) and glucose (15%). Major fatty acids were palmitic acid (33%), oleic acid (13%) and linoleic acid (28%). TLC revealed that glycolipid consisted of 14 components by alpha-naphthol detection. The glycolipid fraction was emulsified in water by sonification, and fractionated by a ConA-Agarose affinity column chromatography. The spots on TLC and sugar composition differed by the fractions and it suggests that the lectin affinity chromatography is a possible method to fractionate glycolipid. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **11**, 7-10, 1990.

分離大豆たん白質には約2%の脂質が含まれている。およそ半分がトリグリセリドを主体とする中性脂質であり、その他はリン脂質と糖脂質である。これらの脂質は表面積の大きい粉体にあるため貯蔵中に酸化されやすく、オフフレーバー生成の原因になる。分離大豆たん白質（SPI）ではリン脂質が酸化されやすいことは既に報告した<sup>1)</sup>。

本研究の目的はSPIの糖脂質を分離し、その性質を明らかにすることであり、本年はとくに、糖脂質の分離方法について検討した。

#### 実験方法

##### 試料

フジプロRを用い、4℃に貯蔵した。

##### 脂質の抽出

分離大豆たん白質（フジプロR）100 g を400 ml の

87%エタノールとホモジナイズし、脂質を抽出した。抽出液を減圧濃縮し、クロロホルムを加え溶解後硫酸ナトリウムにより脱水したのち減圧濃縮したものを脂質画分とした。

##### 脂質の分離

脂質試料0.2 g をケイ酸カラム（2×10 cm）にかけた（Fig. 1）。溶離液はクロロホルム、アセトン、メタノールの順に用い、それぞれの溶出液から中性脂質、糖脂質、リン脂質を得た。ただし、リン脂質画分には糖脂質が含まれるので、メタノール溶出液を塩酸でpH 1.4 に調整するとリン脂質が沈澱した。遠心分離して上澄を分けとり、さきのアセトン画分と併せて糖脂質とした。

##### TLC

シリカゲル60 F254（Merck）を用いた。展開液にはブタノール-酢酸-水（60：20：20）、クロロホルム-メタ

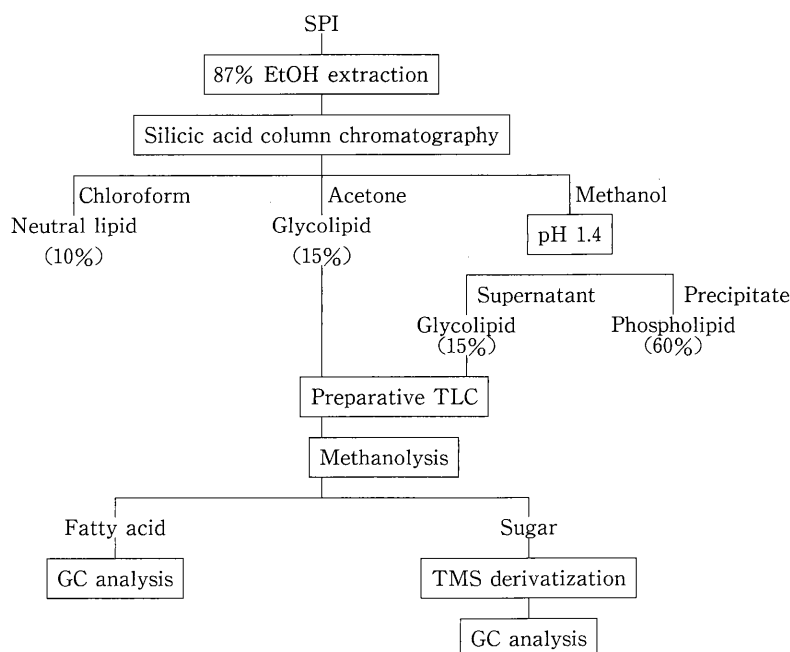


Fig. 1. Separation of glycolipid from soy protein isolate.

ノール-水 (65:25:4) を用いた。検出は  $\alpha$ -ナフトール硫酸を噴霧して温加熱により出現するスポットを糖脂質とした。さらに、強く加熱すると他の脂質成分が黒色のスポットとして検出された。リン脂質の検出には Dittmer 試薬を用いた。

#### 分離たん白質の粗分画

##### 1) 冷沈画分

SPI 100 g を 2 l の水に懸濁し、超音波洗浄器により時々攪拌しながら 1 時間後、常温にて 13,000 g, 20 分間遠心分離した。上澄を 4 °C にて一晩放置後再度 4 °C にて遠心分離した (Fig. 2)。

##### 2) アルカリ溶解

SPI 100 g を 0.01 N カセイソーダに懸濁した。時々超音波洗浄器にかけて攪拌し 3 時間後、4 °C にて 13,000 g, 20 分間遠心分離した。上澄を塩酸にて pH 6 に調整し一晩放置後、食塩を 1 M 濃度になるよう加え pH 4.5 に調整した。遠心分離により上澄と残渣に分けた (Fig. 3)。

以上 2 方法により調製した各画分は凍結乾燥して収率を測定した。各乾燥試料から 87% エタノールにより脂質を抽出し、TLC にかけて脂質成分のパターンを比較検討した。

#### レクチンアフィニティークロマトグラフィー

カラムはアガロースに ConA を固定化したもの (0.5×8 cm) (豊年社製) であり、pH 7.2 リン酸緩衝液

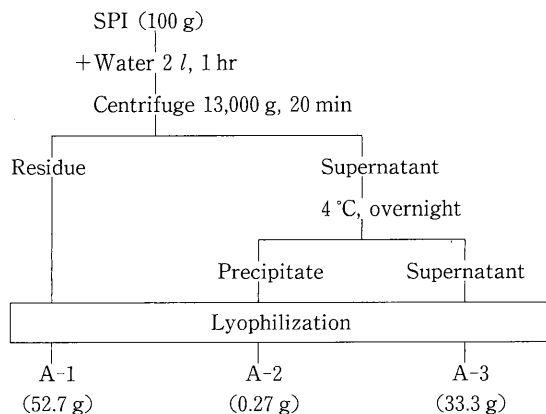


Fig. 2. Fractionation of soy protein isolate by cryoprecipitation.

(0.01 M) で平衡化した<sup>3)</sup>。ケイ酸カラムクロマトグラフィーにより調製した糖脂質 20 mg を 4 ml のリン酸緩衝液に超音波洗浄器で十分分散させ、その 500  $\mu$ l をカラムにかけた。溶出はリン酸緩衝液によりおこない、最後に 0.2 M マンノースにより溶出した。分画は 1 ml とした。それぞれの溶出画分に食塩を加えクロロホルムで脂質を抽出し、濃縮後 TLC にかけた。

#### 糖および脂肪酸の分析

脂質試料に 5% 塩化水素メタノール溶液を加え、100 °C, 4 時間加熱しメタノリシスした。反応液に *n*-ヘキ

サンを加えよく振盪し2層に分離した。ヘキサン層をGLCにかけ脂肪酸組成をしらべた。メタノール層は常法によりTMS化<sup>2)</sup>してGLCにより糖組成を測定した。糖のGLC条件は次のとおりである。

カラム：Silicone GS-101 5% on Uniport HP  
( $\phi 3.1 \text{ mm} \times 5.1 \text{ mm}$ )

温度：190℃

キャリアガス：40 ml/min

## 結果と考察

### 糖脂質の分布

分離大豆たん白質(SPI)を粗分画し、各画分中の脂質のTLCパターンを比較することにより、特定の糖脂質を含むたん白質画分が存在するか検討した。

分画方法はSPIを水に懸濁し冷沈たん白質をとる方法および希アルカリに懸濁、溶解し等電沈澱物を得る方法によりおこなった。各画分中の脂質成分のTLC (Fig. 4)を比較すると、 $\alpha$ -ナフトールにより発色させた糖脂質のスポットには顕著な差はない。一方、リン脂質の方は特定画分に多く存在していることと対照的である。

### 糖脂質画分の分離

87%エタノールでSPIから脂質を抽出した。脂質の収率は約2%であった。ケイ酸カラムクロマトグラフィーの結果、リン脂質を溶出するメタノール画分には糖脂質の一部が混入していたので、メタノール溶液をpH 1.4に調整してリン脂質を沈澱させて分離した。この処理の前後で糖脂質のTLCパターンを比較して変化がないことを確認した。

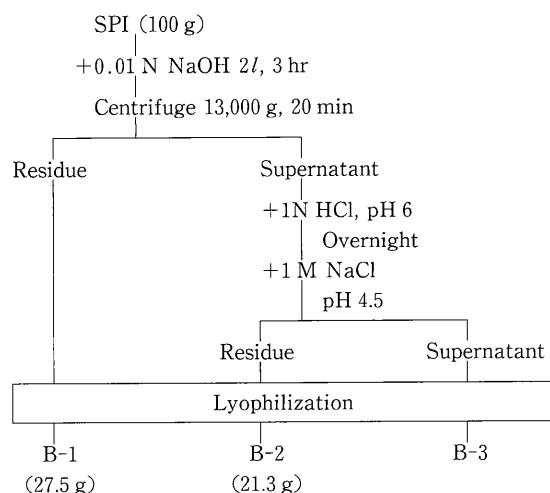


Fig. 3. Fractionation of soy protein isolate by alkaline solubility.

ここに用いた87%アルコール抽出物は中性脂質10%、糖脂質30%、リン脂質60%を含むことが明らかになった。

糖脂質を構成する糖の比率はマンノース35%、ガラ

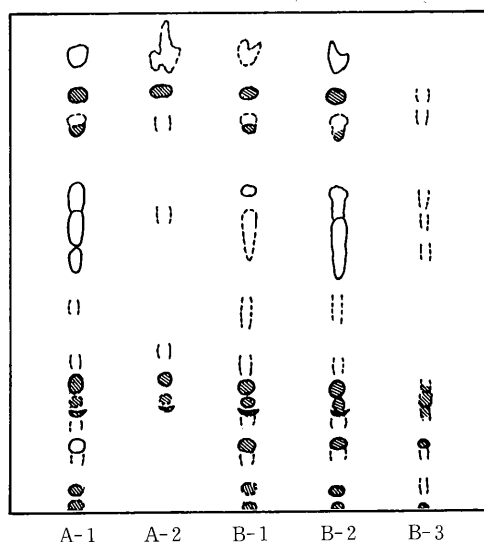


Fig. 4. TLC profiles of lipids in fractionated soy protein isolate.

TLC plate: Silica gel 60 F-254

Development:  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-Water  
= 65 : 25 : 4

Detection:  $\alpha$ -Naphthol sulfuric acid,  
● glycolipid

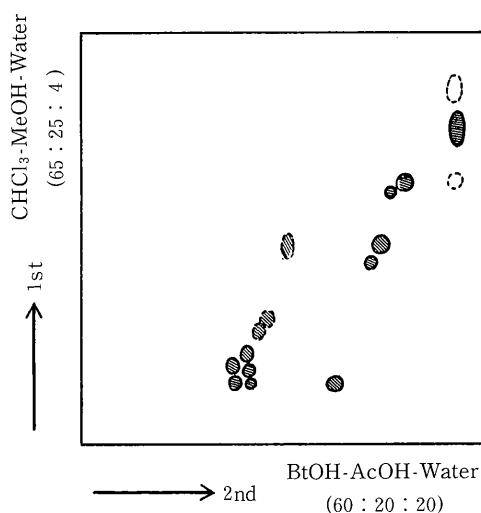


Fig. 5. Two dimensional TLC of glycolipid fraction from SPI.

TLC plate: Silica gel 60 F-254

Detection:  $\alpha$ -Naphthol sulfuric acid,  
● glycolipid

クトース50%, グルコース15%であった。脂肪酸はパルミチン酸33%, オレイン酸13%, リノール酸28%その他であった。

糖脂質を二次元 TLC (Fig. 5) にかけると  $\alpha$ -ナフトール硫酸により検出される14成分が存在したが, この TLC では各成分が互いに接近しており, 分取に供することは困難であった。特に, 一次元展開で Rf の低い成分は別の分離方法を要すると思われる。

そこで糖脂質の糖成分の相違に着目して, レクチンを用いることとした。

#### レクチンアフィニティークロマトグラフィー

ConA アガロースカラムを用いて糖脂質を分画することを検討した。糖脂質は今回は界面活性剤や極性溶媒を用いず超音波洗浄器にかけて水に分散させた。リン酸緩衝液で溶出すると, 明らかに糖脂質成分が分れて溶出され (Fig. 6), 特に TLC 上の Rf の高い糖脂質成分は遅れて溶出された。Fr. 21のスポットはマンノースそのものであり, マンノースによりやっとな溶出される強いアフィニティーを持った糖脂質成分は存在しない。

Frs. 4~6 の糖成分としてガラクトースとマンノースが検出され, ConA のハプテン糖がマンノースであるにもかかわらずガラクトースの方が多く存在したことは糖脂質中のオリゴ糖の結合を示唆する。

この ConA のアフィニティークラムに対する糖脂質の親和性は乳化剤等を利用してより安定なミセルを形成させることにより変り得る可能性もある。また, グルコースやガラクトースを識別するレクチンの利用も検討すべきであろう。

## 文 献

- 1) 藤巻正生, 本間清一 (1987): 分離大豆たん白質

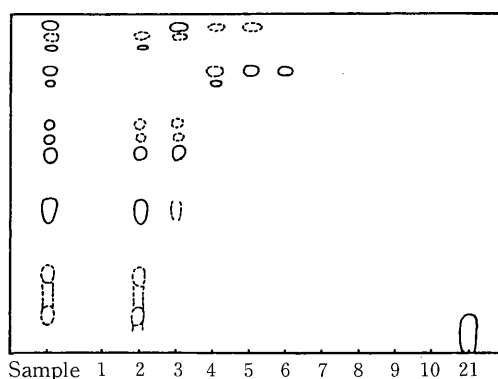


Fig. 6. TLC profiles of fractionate of SPI glycolipid by lectin affinity chromatography.

Sample: Glycolipid fraction of SPI

TLC plate: Silica gel 60 F-254

Development:  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-Water  
=65:25:4

Detection:  $\alpha$ -Naphthol sulfuric acid

の貯蔵中における脂質成分の変化. 大豆たん白質栄養研究会誌, 8, 5-8.

- 2) Harvey, D. J. and Horning, M. G. (1973): Characterization of the trimethylsilyl derivatives of sugar phosphates and related compounds by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatog.*, **76**, 51-62.
- 3) Baenziger, J. U. and Fiete, D. (1979): Structural determination of concanavaline A specificity for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2400-2407.