

分離大豆たん白質の糖脂質成分の解明

CHARACTERIZATION OF GLYCOLIPID IN SOY PROTEIN ISOLATE

本間清一・村田容常(お茶の水女子大学生生活科学部)

Seiichi HOMMA and Masatsune MURATA

Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu University, Tokyo

112

ABSTRACT

Soy protein isolate (SPI) was extracted with 87% ethanol and chromatographed on an Iatrobeds column. Glycolipid was found to be eluted with acetone and methanol. Since the methanol eluate was found to contain glycolipid and phospholipid, the methanol eluate was adjusted to pH 1.4 with HCl to form precipitates. The supernatant was revealed to consist of glycolipid mostly, and it was combined with glycolipid in the acetone eluate. The glycolipid was separated by silica gel TLC with various kinds of developing solvent mixtures. Sugar was converted into alditol acetate and determined by GLC. Ten glycolipids were separated, and the major sugars were found to be galactose and glucose with minor sugars of mannose and rhamnose. According to the molar ratio of sugar to fatty acid, a few kinds of glycerol-type of glycolipid were speculated to be present. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 104-107, 1993.

分離大豆たん白質(SPI)に残存する脂質の量はロットにより変動するようであるがフジプロ R では1~2%の範囲にある。脂質組成は中性脂質、糖脂質とリン脂質である。たん白質の粉体に残存するこれらの脂質は自動酸化を受けやすく、分離大豆たん白質のオフフレーバーを生ずる原因になっており、リン脂質の性質と貯蔵に伴う分解は本会で既に報告している。しかし、糖脂質の性質は未詳であり、その栄養学的評価もさだかでない。本研究は、SPIに含まれる糖脂質の性質を明らかにすることを目的とした。

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50 g に87%エタノール200 mL を加え、5分間ホモジナイズした後、減圧濾過した。残渣は同じ抽出を2度繰り返した。濾液を集め減圧濃縮し、これに飽和食塩水200 mL とジエチルエーテル200

mL を加えて脂質成分をエーテル層に溶転した。水層からエーテルによる脂質の抽出を2度繰り返した。集めたエーテル層は飽和食塩水で洗った後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。

脂質の粗分画¹⁾

イアトロビーズ(Iatrobeds)約25 g をクロロフォルム-メタノール-水(10:10:1, v/v)に懸濁し超音波洗浄器に5分間つけ不活性化と脱気を行った。デカンテーション後、クロロフォルムで洗い、カラムクロマトグラフィーに供した。

カラム容量の5倍容のクロロフォルムで平衡化したカラム(2×20 cm)に100 mg の脂質試料を負荷した。展開はクロロフォルム150-200 mL, アセトン150-250 mL, メタノール200-300 mL の順に行った。溶出液に硫酸による有機物の反応がなくなるまで各溶媒で溶出し、各画分を減圧濃縮し収量を測定した。各画分をシリカゲル TLC (DC-Alufolien Kieselgel 60 F254, Merck)上にスポットし、クロロフォルム-メタノール-水(65:25:4)で展開した。検出は α -ナフトール硫

酸で行った。

酸沈澱法によるリン脂質の分離²⁾

メタノール画分に溶出した糖脂質を分離するため、メタノール溶出液を塩酸で pH 1.4 に調整し、リン脂質を遠心分離で沈澱させた。糖脂質を含む上澄みをアセトン溶出画分と併せた。

脂肪酸と糖成分の分析

糖脂質成分 200 μ g に N-HCl 1 mL を加え密栓し、ブロックヒーターで 100°C、3 時間加水分解した。放冷後ヘキサン 1 mL を加え攪拌し、ヘキサン層をバスツールピペットで分けとった。この操作を 3 回繰り返した。ヘキサン層の遊離脂肪酸を三フッ化硼素メタノール錯体でメチルエステル化し GLC で分析した。GLC の内部標準に methyl margarate, カラムは Silar-10T 10%/Uniport HP 100-120 mesh を用いた。

水層には内部標準試薬アラビトールを 5.0 μ g 加えた後、ゆっくりと炭酸銀で塩酸を中和した。中和の際、時々超音波洗浄器にかけ均一に反応するようにし、炭酸ガスの発生がやみ、試験紙で中和完了を確認した後 AgCl の沈澱を濾過した。濾液を減圧濃縮し KOH デシケーターで乾燥した。0.22 M の NaBH₄ 水溶液 200 μ L を加え、室温で 2 時間放置し還元した。酢酸を 1 滴加え過剰の NaBH₄ をこわした後減圧乾固した。メタノールを加え濃縮する操作を 3 回繰り返した後、濃縮物を KOH デシケーター中で完全に乾燥した。次いで、ビリジンと無水酢酸各 100 μ L を加え密栓し、ブロックヒーター上で 100°C、2 時間加熱した。放冷後トルエン 1 mL を加え減圧乾固する操作を繰り返しアセチル化試薬を溜去し、GLC にかけた。

GLC 条件は次のとおりである。カラム：Silicone OV-225 1%/Uniport HP 80-100 mesh (3 mm×3.1 m), カラム温度 190°C (恒温), N₂ 流速 40 mL/min。

TLC による糖脂質の分離

糖脂質試料約 30 mg を少量のクロロフォルムに溶かし分取用 TLC プレート (PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254, 1.0 mm Schichtdicke, Merck) に線状に着点した。展開の後プレートの両端を α -ナフトール硫酸で発色し、これをガイドとして糖脂質に相当する部分のシリカゲルを剝離した。クロロフォルム-メタノール-水 (10:10:1, v/v) を加え超音波洗浄器にかけ 5 分間抽出した。抽出操作は 2 回繰り返した。剝離の際シリカゲルが飛び散らないように軽く水を噴霧した。

シリカゲルから抽出した脂質成分はさらに分析用 TLC プレート (DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254, 0.25 mm Schichtdicke, Merck) に着点し再展開した。剝離、抽出はさきと同様に行った。分離不十分な成分

はさらに同じ分析用 TLC プレートで分離した。

TLC の展開溶媒は下記の 4 種類である：

- 1) クロロフォルム-メタノール (90:10)
- 2) クロロフォルム-メタノール-水 (65:25:4)
- 3) クロロフォルム-メタノール-水 (60:40:10)
- 4) ブタノール-酢酸-水 (60:20:20)

各糖脂質成分の分離に用いた展開液の種類と順序は下記のとおりである：

成分 1, 2, 3, 4 $\cdots$ 2) $\rightarrow$ 1) $\rightarrow$ 2)

成分 5, 6 $\cdots$ 1) $\rightarrow$ 4) $\rightarrow$ 2)

成分 7, 8, 9 $\cdots$ 2) $\rightarrow$ 4) $\rightarrow$ 2)

成分 10 $\cdots$ 3) $\rightarrow$ 4) $\rightarrow$ 2)

シリカゲルカラムクロマトグラフィー

糖脂質画分 100 mg をシリカゲル (和光純薬) カラム (2×20 cm) にかかけ、クロロフォルム-メタノール-水 (65:25:4) で展開した。溶出画分を分析用シリカゲル TLC にてクロロフォルム-メタノール-水 (45:25:4) で展開、 α -ナフトール硫酸で検出し、画分 A, B に大別した。画分 A を同じサイズのシリカゲルカラムに再度かけクロロフォルム-メタノール-水 (130:25:4) で展開し、糖反応の結果により Fr. 1, 2, 3 に分画した。さらに、TLC で糖検出のあった Fr. を同サイズのシリカゲルカラムにかけブタノール-酢酸-アンモニア (240:1:1) で展開した。

HPLC

糖脂質画分 B を Capcelpak-C18 (4.6×250 mm, 資生堂) にかかけ、ステップワイズにメタノール-水系の濃度比 (90:10 $\rightarrow$ 95:5 $\rightarrow$ 100:0) を変え溶出した。HPLC の検出は 220 nm の吸光度で行い、溶出液を濃縮し糖反応を調べた。

結果と考察

糖脂質画分の調製と収率

分離大豆たん白質から調製した脂質をイアトロビーザカラムにかけて、中性脂質 (クロロフォルム画分)、糖脂質 (アセトン画分)、リン脂質 (メタノール画分) に分画した。TLC (Fig. 1) の結果、メタノール画分にも糖が溶出されるので、メタノール画分の pH を 1.4 に調整して生ずるリン脂質を主体とする沈澱を除去した上澄みに糖脂質があり、上澄みをアセトン画分と併せ本実験の糖脂質画分とした。

100 g の SPI から 0.12 g の中性脂質、0.58 g の糖脂質 (アセトン画分 0.10 g, メタノール画分 0.48 g), 1.02 g のリン脂質が得られた。検出された糖はアセトン画分、メタノール画分ともガラクトースとグルコースであった。

シリカゲルカラムによる分離

本実験では糖脂質成分の化学構造の解析には最終的には機器分析が必要になるので、各糖脂質成分をかなり多く単離する必要があると考え分離手段にカラムを用いた。

まず、シリカゲルカラムにかけ、クロロフォルム-メタノール-水(65：25：4)で展開し、A、Bの2成分に分けた。Rf の高いA成分はさらにシリカゲルカラムで極性をおとしたクロロフォルム-メタノール-水(130：25：4)で展開すると Fr 1, 2, 3 に分かれ、Fr 2, 3 は糖を含んでいた。糖脂質画分 Fr 2, 3 は酸、あるいは塩基を含む展開液で同じカラムを用いて分離をすすめている。一方、Rf の低いB成分は、C18 逆相系カラムを用いる HPLC にかい含水メタノール系で展開しているが、十分な分離の傾向がみられていない。

そこで、カラムによる分離と平行して TLC を主体とする分離をすすめた。

糖脂質の TLC による分離

糖脂質画分をシリカゲル TLC に3回かけて10個の糖脂質成分に分離した。各糖脂質成分を加水分解し、

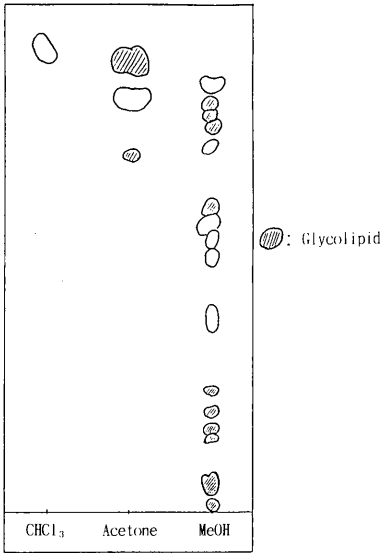


Fig. 1. TLC profile of lipid classes of soy protein isolate prepared by Iatrobeads column chromatography.
TLC: Silica gel 60, F 254 (Merck)
Development: Chloroform/Methanol/Water (65: 25: 4)
Detection: Alpha-naphthol sulfuric acid

Table 1. Molar ratio of sugar and fatty acid in glycolipid components separated from soy protein isolate

Glycolipid	Sugar			Fatty acid							Total			
	Gal	Glc	Others	Total	C12: 0	C14: 0	C16: 0	18: 0	C18: 1	C18: 2		C18: 3	Others	
1		13	2.0*1	15	2.9	3.3	6.0	3.9	9.9			7.4	8.3*3	42
2		39		39	1.6	2.8	6.4	3.1	1.5		1.4	1.7		19
3		7.7		7.7	5.5	6.0	11	9.0	2.8		0.4	2.8		38
4	2.5	2.0		4.5	2.6	4.2	8.9	5.9	3.7			4.7	6.1*4	36
5		81		81	5.8	2.8	10	2.6	3.5		26	1.7		52
6	34	30	43*2	107	1.9	3.0	10	6.2	3.5		5.1	8.1		38
7		11		11	5.1	5.7	8.9	8.8	2.4			1.3		32
8		4.4		4.4	0.5	2.4	7.0	5.2	2.7		3.9	4.9		27
9		2.8	6.0*2	8.8		4.2	6.9	5.6	1.9			3.5		22
10		23		23	1.6	3.5	6.7	3.2	3.9					19
Gal: galactose Glc: glucose														
*1: mannose *2: rhamnose *3: C20: 0 *4: C10: 0														

脂肪酸はメチルエステル、糖はアルジトールアセテートの誘導体にして GLC にかけた。Table 1 に各糖脂質成分の構成糖と脂肪酸の組成とモル比を示した。

糖としては、グルコース、ガラクトース、少量のラムノースとマンノースがみとめられた。成分 1 はマンノースとグルコースが 1:6 で含まれ、かつ脂肪酸の割合が糖に比べ高いので他の脂質成分の混入か、少なくとも 2 種類の糖脂質が混在していると推定される。成分 2, 6, 9 は 2 ないし 3 種類の糖がほぼ整数比で存在するので、糖鎖部分はオリゴ糖として存在するか、複数の糖脂質の混在が推定できる。

脂肪酸としてカプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸が検出された。脂肪酸の不飽和度は成分 5 を例外とすれば低く、大豆油のようにリノール酸とリノレン酸で約 60% を占める脂肪酸組成とは大きく異なる。また、炭素鎖長も短い C₁₂, C₁₄ 脂肪酸の割合が高いのが糖脂質成分のおおまかな特徴であろう。リノール酸の割合が 50% を占める成分 5 を除くと糖成分モル数と同じレベルのモル数で存在する脂肪酸がなく、かつ、いずれの脂肪酸も糖より少ないことから糖脂質には脂肪酸の異なる同族列が存在すると推定される。

本実験では、脂肪酸の合計と糖のモル比が整数になることが糖脂質成分の精製の目安になると考えた。成

分 3, 4, 7, 8 は糖に対する脂肪酸のモル数が大過剰であるから他の脂質成分の混入が考えられる。

グリセロタイプの糖脂質と想定すると成分 2, 5, 6, 10 の糖鎖部分はそれぞれ 4, 3, 3, 2 糖^{3,4)}であると推定される。その確認は糖成分と一緒にグリセロールの定量を行うか、単離成分の NMR などの機器分析で解析する必要がある。

今後カラムと TLC, HPLC など適宜組み合わせて分離操作をすすめる。

文 献

- 1) Kates M (1975): 脂質研究法. 東京化学同人, 108-110.
- 2) 本間清一, 三田知子, 村田容常 (1991): レクチンアフィニティークロマトグラフィーによる分離大豆たん白質成分の分離方法の検討. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **12**, 19-22.
- 3) Fujino Y and Miyazawa T (1979): Chemical structures of mono-, di-, tri- and tetraglycosyl glycerides in rice bran. *Biochim Biophys Acta*, **572**, 442-451.
- 4) Kondo Y (1981): Alkylether linkage-containing oligoglycolipid in germinating black grams. *Biochim Biophys Acta*, **665**, 471-476.