

分離大豆たん白質のグリセロ糖脂質

GLYCEROLIPID 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 (4 kg, SPI) was extracted by 86% ethanol and purified by Iatrobeads column, from which glycolipid was eluted by acetone and methanol. MeOH- and acetone-eluted fractions were then purified by silica gel column chromatography, being eluted with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{water}$, BuOH/AcOH , and $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, and Sephadex LH-20 column chromatography, being developed with MeOH. Each fraction was analyzed by TLC, being detected by α -naphthol/ H_2SO_4 reagent. The sugar and fatty acid compositions of the obtained eleven fractions were analyzed by acid-hydrolysis, HPLC and GC. The nitrogen contents were also determined. Me-2-b (146 mg) and Ac-6-a (76 mg), being the major glyceroglycolipids in SPI, were composed of glucose, galactose and palmitic acid (1:1:2), and glucose and palmitic acid (1:1), respectively. Me-1-b was considered to be a sphingoglycosyllipid. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 28-31, 1994.

分離大豆たん白質には数%の脂質成分が残存しており、酸化されオフフレーバーの原因となる。分離大豆たん白質あるいは酵素水解ペプチドなどを飼料とする動物実験においてたん白質の性質のみでは説明し難い結果を散見することがあり、その一つの原因にたん白質に付随する脂質などの成分の寄与も考えられる。また、分離大豆たん白質を構成する成分を把握することは食品素材としての加工、貯蔵、利用を適切に行う上で重要であると考えられる。我々は、その脂質成分の中で、石油系溶剤の脱脂で比較的溶解しにくい糖脂質について検討をしている^{1,2)}。今回は、試料を大量に調製し、分離法、分析法を改良し、グリセロ糖脂質及びスフィンゴ糖脂質を分離・分析した結果を報告する。

実験方法

試料

分離大豆たん白質(フジプロ R, SPI)を4℃で保存し、用いた。

脂質の抽出

SPI 約400 g を86%エタノール1.6 L で3回抽出した。抽出液を減圧濃縮後、エチルエーテルと飽和食塩水各800 mLを加え、脂質をエーテルに溶解した。エーテル層を分取した後、水層を2回エーテルで洗い、先のエーテル層と合わせた。無水硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮した。この抽出操作を8回繰り返し、合計3.2 kgの試料を処理し、44.8 g(収率:約1.4%)の粗脂質を得た。

イアトロビーズカラムクロマトグラフィー²⁾

粗脂質を約20 gずつ2回に分け、それぞれを、前処理したイアトロビーズをクロロホルムで充填したカラム(3.8×85 cm)にかけ、クロロホルム、アセトン、メタノールの順にそれぞれ約7 Lで溶出した。各溶出画分をシリカゲル TLC(Merck 5554)でクロロホルム-メタノール-水(65:25:4)により展開し、硫酸または α -ナフトール/硫酸で検出した。分離大豆たん白質100 g当りの各脂質画分の収率はクロロホルムが

0.15 g, アセトンが0.28 g, メタノールが0.88 gであった。糖の検出反応で見ると、アセトン画分は原点付近から Rf 0.9まで広く認められたが、メタノール画分は原点近傍の成分のみに糖が検出された。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー

1) アセトン画分 アセトン画分脂質を約4.5 g ずつ2回にわけ、それぞれシリカゲル (Merck 7734) のカラム (2.8×50 cm, 175 g) につけ、クロロホルム-メタノール-水系 (500:25:4→260:25:4→130:25:4→45:25:4→メタノール) で順次展開した。1 Fr 20 mL で計170 Fr を分取し、先と同じシリカゲル TLC につけ糖の検出の陽性であった Rf が0.4-0.6付近で比較的不純物が少ないと考えられた Fr 29-32 (Ac-2) と Fr 49-52 (Ac-6) を集め濃縮した。

Ac-2画分330 mg はシリカゲルカラム (2.0×18 cm, 16 g) につけ、n-ブタノール-酢酸 (100:0.05) 約300 mL で展開し、分画した。溶出された各画分をシリカゲル TLC (展開液; ブタノール-酢酸=100:0.05, v/v) につけ糖検出を行い、Rf 0.29程度の糖反応で単一の Fr 29-50を集め試料 Ac-2-b とした。Ac-2-b は2回に分け、Sephadex LH-20カラム (1.0×28 cm) につけ、メタノールで展開した。その結果、Ac-2-b-I (34 mg) 及び Ac-2-b-II (13 mg) を得た。

Ac-6画分230 mg はシリカゲルカラム (2×13 cm, 16 g) につけ、クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水系 (85:15:1.5→70:30:1.5→60:40:1.5→メタノール, 各300 mL) で展開し、シリカゲル TLC (展開液; クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水=70:30:1.5) で単一の糖スポットである Fr 21-70を集め試料 Ac-6-a (75.6 mg) とした。

2) メタノール画分 メタノール画分脂質28.3 g をシリカゲルカラム (5.6×90 cm, 500 g) につけ、クロロホルム-メタノール-水系 (260:25:4→65:25:4, 各3 L) で展開し、溶出成分をシリカゲル TLC (展開液; クロロホルム-メタノール-水=65:25:4) で糖検出を行った。ほぼ単一の糖スポットを与えた Rf 0.14 の Fr 15-17 (Me-1) と Rf 0.12 の Fr 18-21 (Me-2) を集めた。

次いで、Me-1画分450 mg をシリカゲルカラム (2.2×18 cm, 22 g) につけ、酢酸エチル-メタノール-28%アンモニア水 (33:66:1) で展開し、溶出成分をシリカゲル TLC (展開液; 酢酸エチル-メタノール-28%アンモニア水=33:66:1及び酢酸エチル-メタノール-1 N HCl 5:5:0.1) で糖検出を行った。Rf 0.07-0.17の Fr 20-35 (Me-1-a) と単一の糖スポットを与えた Rf 0.07の Fr 45-75 (Me-1-b, 84 mg) を集めた。

Me-1-a 画分 (90 mg) は更に Sephadex LH-20カラム (1.0×28 cm) につけ、メタノールで展開した。その結果、溶出順に Me-1-a-I (7 mg), Me-1-a-II (65 mg), Me-1-a-III (8 mg), Me-1-a-IV (21 mg) を得た。

Me-2画分280 mg を Me-1画分と同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにつけ、Rf 0.14の Fr 14-34 (Me-2-a) と糖スポットが単一である Rf 0.09の Fr 35-96 (Me-2-b, 146 mg) を集めた。Me-2-a (130 mg) は更に Sephadex LH-20カラム (1.0×28 cm) につけ、メタノールで展開した。その結果、溶出順に Me-2-a-I (120 mg) 及び Me-2-a-III (24 mg) を得た。

脂肪酸と糖組成の分析

分離糖脂質画分約1 mg に1 N HCl 1 mL を加え、100℃, 3時間加水分解した。放冷後、ヘキサン 1 mL を加え、攪拌し、ヘキサン層を分け取った。この操作を3回繰り返し、ヘキサン層の遊離脂肪酸を3フッ化ホウ素メタノールでメチルエステル化し、GLC 分析した¹⁾。

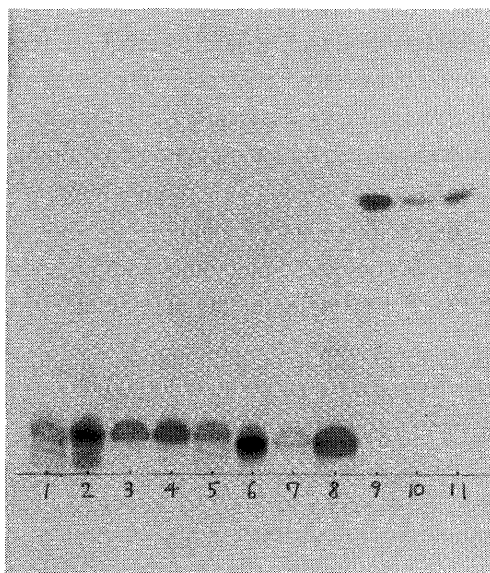


Fig. 1. TLC of glycolipids purified from SPI.
TLC: Silica gel 60 F254 (Merck)
Development: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=62:25:4$
Detection: α -Naphthol/ H_2SO_4
1, Me-1-a-I; 2, Me-1-a-II; 3, Me-1-a-III;
4, Me-1-a-IV; 5, Me-1-b; 6, Me-2-a-I; 7,
Me-2-a-III; 8, Me-2-b; 9, Ac-2-b-I; 10,
Ac-2-b-II; 11, Ac-6-a

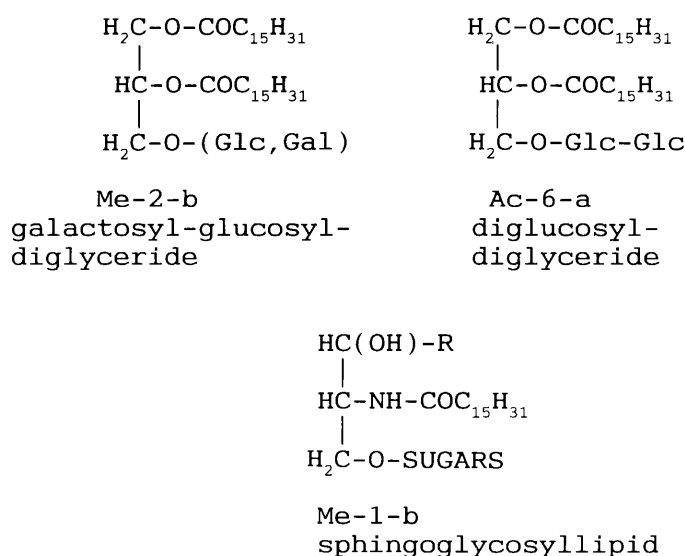


Fig. 2. Structure of glycolipid in SPI.

下層は HPLC による糖分析を行った。分析条件は、カラム、日立ゲル#3013-N（陰イオン交換）；溶離液、ホウ酸-NaOH；流速、0.4 mL/min；検出、リン酸-フェニルヒドラジン試薬によるポストカラム法（蛍光検出、Ex 330 nm, Em 470 nm）である。

窒素の分析

定性分析は、TLC 上ライドン-スミス反応及び Clor-ox 反応で検出した。両反応に陽性だった、Me-1-a-I, Me-1-b, Ac-6-a については、窒素を定量した。

結果と考察

分離大豆たん白質より脂質を抽出した。脂質含量は約1.4%であり、従来の含量よりやや少なかった。抽出脂質をイアトロビーズカラムにかけ、グループ分画すると、分離大豆たん白質100 g 当り各脂質画分の収率はクロロホルムが0.15 g, アセトンが0.28 g, メタノールが0.88 g であった。アセトン画分が粗糖脂質画分、メタノール画分が粗リン脂質画分であるが、メタノール画分は収量が大きく、また糖の発色もかなり認められたためアセトンおよびメタノールの両画分を精製することにした。

両画分は、TLC 上での糖の検出反応と硫酸発色を指標として、各種溶媒系でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し、また Sephadex LH-20によりゲル濾過クロマトグラフィーを行い、TLC 的にかなり単

一であると考えられる11画分（Me-1-a-I, Me-1-a-II, Me-1-a-III, Me-1-a-IV, Me-1-b, Me-2-b, Me-2-a-I, Me-2-a-III, Ac-2-b-I, Ac-2-b-II, Ac-6-a）を得た（Fig. 1）。収量的には Me-2-b, Me-1-b 及び Ac-6-a がそれぞれ SPI 4kg より146 mg, 84 mg, 76 mg と多く、SPI の主要糖脂質と考えられた。

得られた11画分の窒素分析の結果 Me-1-a-I 及び Me-1-b は窒素を2%程度含んでおりスフィンゴ糖脂質であると考えられた。主な構成脂肪酸はパルミチン酸であった。

各画分の脂肪酸及び糖組成を分析した結果、Me-2-b 及び Ac-6-a はその組成から比較的純度が高い成分であると考えられた。Me-2-b は脂肪酸と糖の組成比が1：1であり、主要な糖はグルコース及びガラクトース、主要な脂肪酸はパルミチン酸であり、ガラクトシルグルコシルジパルミトイルグリセリド（Fig. 2）であると推定された。また、Ac-6-a は脂肪酸と糖の組成比が1：1であり、主要な糖はグルコース、主要な脂肪酸はパルミチン酸であり、ジグルコシルジパルミトイルグリセリド（Fig. 2）であると推定された。

今後 Me-2-b 及び Ac-6-a の構造を決定するとともに他の成分についても検討する必要がある。

文 献

- 1) 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.

2) 本間清一, 村田容常 (1993): 分離大豆たん白質の糖脂質成分の解明. 大豆たん白質研究会会誌, **14**, 104-107.