

大豆たん白質の化学修飾：溶質性の改質

山内 清*・徳田拓弥・山添泰宗

大阪市立大学工学部

Chemical Modification of Soy Protein Isolate : Miscibility Control

Kiyoshi YAMAUCHI, Takuya TOKUDA and Yasunori YAMAZOE

Faculty of Engineering, Osaka City University, Osaka 558-8585

ABSTRACT

Upon mixing with various epoxides including glucidol, styrene oxide and epoxydecane at pH 9.5-10, soy protein isolate (SPI) was hydroxyalkylated, mainly at the lysine residues, to produce SPI-CH₂CH(OH)R where R is CH₃, CH₂OH, C₆H₅ or *n*-C₈H₁₇. The modified SPI was (i) soluble in water of a wide pH range (5-10) when R is CH₂OH and *n*-C₈H₁₇ or (ii) miscible readily with water and organic solvents such as methyl ethyl ketone and dimethylformamide when R is CH₃ and C₆H₅. In the second phase of the study, SPI was esterified by a combination of thionyl chloride and alcohol such as methanol and ethanol. The methylated SPI was very soluble in water to afford a viscous solution while the ethylated SPI was miscible readily with water and most polar organic solvents. The modified SPI was discussed for industrial applications. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 36-40, 1998.

Key words : chemical modification, esterification, glucidol, styrene oxide, epoxydecane, soy protein isolate

数多い天然高分子のなかでもたん白質を非食品工業素材として扱う研究は大変少ない。合成高分子の繁栄のなかで出番を失っていたのである。しかし、約半世紀を経て再び舞台に出ようとしているように思われる。それは、たん白質はアミノ基、水酸基、チオール基、フェノール基、カルボン酸基と多様な感応基に富むことから有機化合物による化学修飾が可能であるほか、無機化合物との複合体の形成にも適していて、合成高分子では表現できない機能を有した新素材が作製できると期待されるからである¹⁻⁴⁾。さらに、たん白質の修

飾に適した多数の反応が発見されてきた^{5,6)}。修飾試薬も多様に安価に供給されるようになってきた。時も熟しつつあるように思われる。そこで大量入手性があり分子量が大きい酸性沈澱たん白質(SPI)⁷⁾や他の構造的たん白質の化学修飾を系統的に研究することとした⁸⁻¹¹⁾。本稿ではSPIのエステル化による荷電の調節とたん白質の側鎖の水酸基等の付加による溶質性の改質について主に報告する。以下に述べるように化学修飾はいずれも1段反応で行った。

方 法

* 〒 558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138

SPI へのヒドロキシアルキル基, $-\text{CH}_2\text{CCH}(\text{OH})-\text{R}$ の導入 (例)

SPI (フジプロ-R, 10 g) を水 (110 mL) に均一に分散してから, 1 M NaOH 水溶液 (5.0 mL) を加え pH を約 10 に調節してから, グリシドール (1,2-epoxy-3-hydroxypropane) (3 mL) を添加した. 混合物を室温で 5 時間攪拌後, 1 M HCl で pH 7 に調節し, 全体をメタノールに注ぎ, 得られた沈澱物をろ過して集め, 減圧で乾燥するか, あるいは沈澱物を水に分散して凍結乾燥して白色パウダーを得た; 収率, 9.5 g.

SPI のメチルエステル化 (例)

SPI (フジプロ-R, 10 g) をベンゼンにより共沸脱水した. おおよそ -10°C に冷却したメタノール (120 mL) に塩化チオニル (10 mL) を徐々に加えてエステル化剤を用意し, これを先の脱水 SPI に加え, そのまま室温に徐々に戻しながら計 3 時間, 攪拌した. 得られたたん白質をろ過分離しメタノールで洗浄後, 減圧乾燥したところ淡い茶色の粉体が得られた.

溶解性

修飾たん白質 (1 g) を水 (19 g) に分散し, pH 5, 7, 9, 10 に 1 M の水酸化ナトリウム水溶液で調節し, 室温で約 5 分間攪拌した. 室温に戻してから濁度を目視および 600 nm での透過度で観察し溶解性を吟味した. 無色で透明, 透過度が 50% 以上であった場合を“溶解”, 不溶物が残り白濁分散液状態であるとき“不溶”とした. また, 透過度が 50% 以下の場合“不均

一分散”と一律に区分した (Table 1).

粘度の測定

たん白質濃度が 5 wt% の溶液を調製し, 25 および 50°C で BL 型回転粘度計 (トキメック製) で所定の方法で測定した.

結果と考察

エポキシ化合物との反応による OH 基の導入

エポキシ環は親核基の攻撃を受けて Fig. 1 に示すように OH 基を付与することが知られているが¹²⁾, 本反応をたん白質の化学修飾に展開した例は未だ見あたらない. 使用したエポキシ化合物は $\text{R}=\text{CH}_3$, CH_2OH , C_6H_7 , C_6H_5 である. 処理反応時間は, アルカリ化条件で行われたので, たん白質加水分解を抑えるべく 3~5 時間に止めた. 反応は室温にてたん白質の塩析剤である硫酸ナトリウム非共存化ないしは存在下で行ったが, 塩析剤による修飾位置や程度への効果は見られなかった. しかし, 反応系の pH の影響は大きく約 9.5 以上で反応することがわかった. このアルカリ条件ではリジンの NH_2 (10.3), チロシンの OH 基 (10.1), イミダゾールの NH 基 (6.0), システインの SH 基 (10.0) が親核基として有効でありエポキシ環と反応すると思われる [() 内の数字は pKa]. 事実, 修飾 SPI のアミノ酸分析はこれらのアミノ酸の修飾を支持した. Fig. 2 にエポキシ化合物 (1: $\text{R}=\text{CH}_2\text{OH}$) を使った場合の修飾た

Table 1. Solubility, miscibility and viscosity of modified SPI

	Solubility (room temperature) ^{a)}				Miscibility to water	Viscosity (cP) ^{b)} 25°C, pH 8
	pH 5	pH 7	pH 9	pH10		
SPI ^{c)}	×	△ ○	○	○	sparingly miscible	3.7
$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ^{d)}	×	×	△	○	miscible	3.4
$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ ^{d)}	○	○	○	○	soluble	2.8
$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_5$ ^{d)}	×	×	×	×	miscible	—
$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_7$ ^{d)}	○	○	○	○	miscible	3-6
$-\text{COO}-\text{CH}_3$	○	○	○	○	soluble	>100 (37-40 at 2.5 wt%)
$-\text{COO}-\text{C}_2\text{H}_5$	×△	×△	×		miscible	—

a) Solubility: ○ soluble completely; △ heterogenous dispersion; × insoluble.

b) Viscosity of 5 wt% solution.

c) An isoelectric point of SPI is 4.5-4.8.

d) The hydroxyalkylated lysine residue of SPI is displayed as an example.

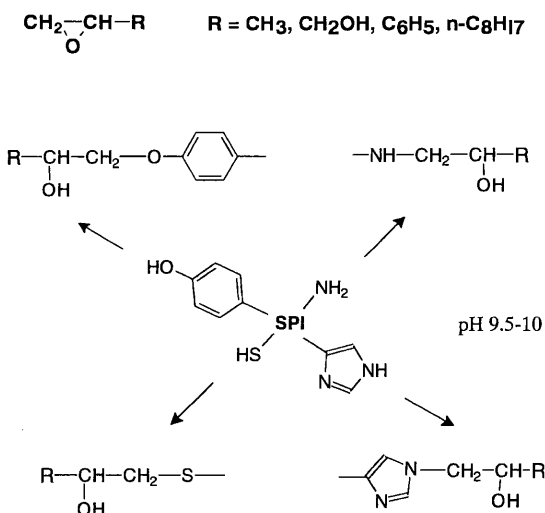


Fig. 1. Modification of SPI by various epoxides.

ん白質全体のアミノ酸分析を例示しているが(黒バー), これらのアミノ酸 (計約 13%) がほぼ全て $-\text{CH}_2\text{CH(R)}\text{OH}$ で修飾されている. $-\text{[CH}_2\text{CH(R)O]}_2\text{H}$ の様に複数のヒドロキシルアルキル基での修飾 (エポキシ環重合) はほとんど起こっていないと推定された (0.5% 以下). しかし, エポキシドでも $\text{R} = \text{C}_8\text{H}_{17}$ の場合は反応性が低く, アミノ酸分析から推定される修飾化度は 3 ~ 7% に止まった.

概して, ヒドロキシルアルキル化 SPI の SDS アクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は, SPI に比べて, CBB も銀染色も難しく不鮮明な像であるが, パターンはおおむね SPI に似ている. CD スペクトルはどれもほとんどランダムコイル構造であることを示唆した. 溶液粘度は同条件でのアルカリ可溶性 SPI 溶液 (pH 8) と比較してやや低下している.

ヒドロキシルアルキル化 SPI の溶解性は特に水を溶媒とした場合に大きく変化した (Table 1). すなわち, $\text{R} = \text{CH}_2\text{CHOH-CH}_2\text{OH}$ では常温水に易溶となり, 半永久的に沈澱を生じることのない無色透明な低粘度の溶

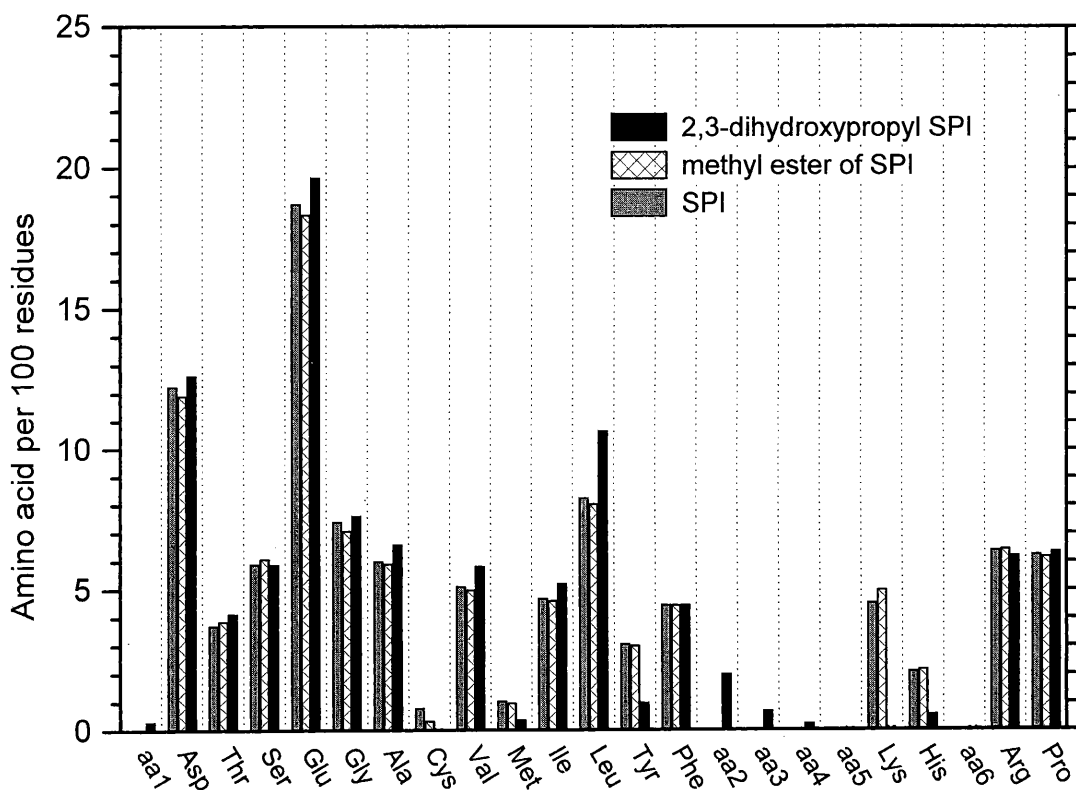


Fig. 2. Amino acid analysis of the starting SPI, 2, 3-dihydroxypropyl SPI and methylated SPI. The samples were assayed after exhaustive acid hydrolysis. The aa1-aa6 are unknown amino acids. The aa2 had the same retention time as N^{ϵ} -(2, 3-dihydroxypropyl) lysine.

液 (5 重量%, pH 5 ~ 7 水溶液で 3 ~ 6 cP) を得た。疎水性の高い $R=CH_2CH(OH)-(CH_2)_{11}CH_3$ でも、修飾化度が低いにもかかわらず、水に易溶であった (ヘキサソラン、二塩化メタン、アルコールなどの有機溶媒には不溶)。一方、 $R=C_2H_5$ の場合では中性水に難溶、メタノールによく分散した。 $R=C_6H_5$ では水に全く不溶であった。修飾鎖の影響がよく現れているといえよう。

エステル化

大豆たん白質のアスパラギン酸やグルタミン酸のエステル化は 50 年前またそれ以後も断片的に試みられたようであるが実体不明なまま現在に至っている¹³⁾。反応系での脱水操作の不完全さ、それによる酸加水分解による生成物の複雑さが原因だったのであろうか。私どもはメタノールまたはエタノールと塩化チオニルを組み合わせたエステル化を試みたが、反応系は軽度な着色のみであって、SPI のアスパラギン酸とグルタミン酸のほぼ全量または部分的に修飾をすることができた (Fig. 3)。メチル化が約 60% 進んだ SPI の CD スペクトルを Fig. 4 に示すが、 α -ヘリックス構造がかなり残っている。泳動図では SPI の 70, 66, 36 kDa 成分が消失し、新たにおおよそ 33 と 22, 10 kDa をそれぞれ主、副成分とする比較的小さなたん白質の泳動図である。エステル化にともない 7S, 11S のサブユニット成分⁸⁾ (エステル化されている) への解離が起こったのかも知れない。アミノ酸分析は加水分解処理サンプルをつかうので SPI と同等であった (Fig. 2, xx バー)。

カルボン酸基のエステル基への中性化は物性に大きく影響した。カチオン性たん白質であるエステル化 SPI の等電点電気泳動は染色発色が難であり正確な値が得られていないが、リジンなどの塩基性アミノ基の陽イオン化に伴い等電点が低下していることは確かである。たとえば、等電点の低下は、エステル化大豆たん白質の水溶液をコラーゲン、絹フィブロインやポリアクリル酸などの陰イオン性高分子水溶液 (pH 7) と混合すると瞬時に白濁ゲル化するが、中性および陽イオン性高分子水溶液 (pH 7) とは凝集現象を示さないことにも現れている。

溶解性についても大きな変化が見られた (Table 1)。

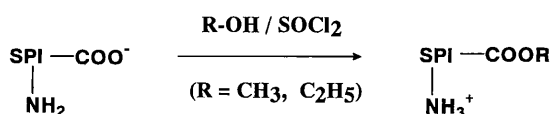


Fig. 3. Esterification of SPI. The product at neutral pH is shown.

すなわち、メチル化 SPI は広い pH 領域 (3 ~ 9) で水溶性となり、2.5 重量% 溶液でさえ粘度が 80 cP の高い透明水溶液を与えた。カチオン性側鎖間の反発により球状の SPI 分子が伸びたために溶液粘度が増加したのであろう。

一方、エチル化についてはエステル化度が 100% 近いと疎水性が上がり水に不溶性となったが、エステル化度が 30 ~ 60% 程度の場合は逆に水への分散性が向上した。これも SPI 分子の形態と側鎖の親水性、疎水性のバランスによって説明されよう。

水溶性修飾大豆たん白質の利用分野についての一考察

現在、工業的に多量に生産されているたん白質として牛皮などのコラーゲン、ゼラチン、羊毛のケラチンパウダーがある (5,000 円/kg)。これらはいずれも水溶性または分散性に優れるたん白質であり、人工皮革、塗料、化粧品基材、界面活性剤等に応用されている。

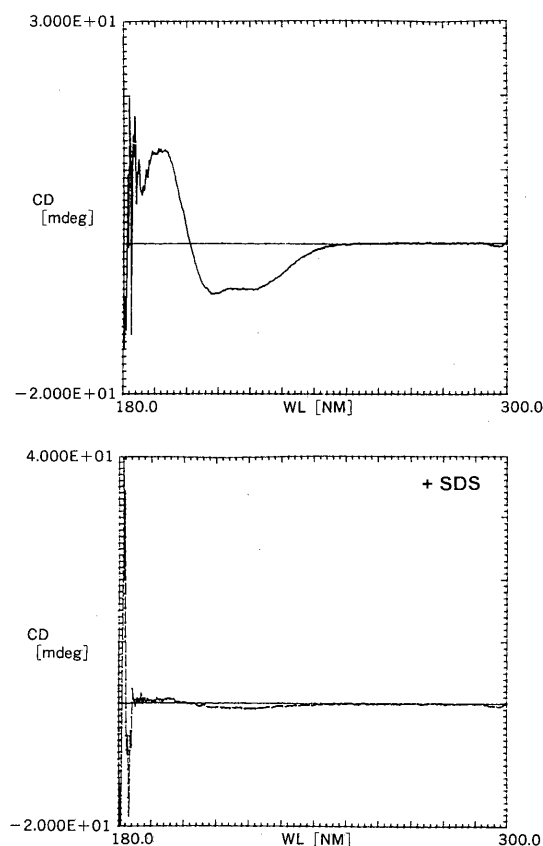


Fig. 4. The CD spectra of an aqueous solution of the methyl ester of SPI in the absence (upper panel) and presence (lower panel) of sodium dodecyl sulfate (SDS).

いずれもたん白質の吸放湿性、透湿性、感触性などの特質に基づいている。

さて、本研究で得られた修飾 SPI はそのまま水溶性のもの（メチルエステル化 SPI, ヒドロキシアシル化

SPI）と水や有機溶媒に対して分散性が改質されたもの（エチルエステル化 SPI, ヒドロキシプロピル化 SPI など）であるが、現在、上記分野での展開について調べている。

要 約

大豆油の製造過程で得られる酸沈澱分離たん白質（SPI）は大量入手性があり、分子量が大きいので食品分野のみならず工業素材としても恰好な物質である。本研究は大豆たん白質の化学修飾を系統的に行い、非食品用途への可能性を検討しようとするものである。ここでは SPI のエステル化とたん白質の側鎖のヒドロキシアシル化による溶質性の改質について報告する。改質大豆たん白質とその主な特徴は次のようである。

1. 大豆たん白質と種々のエポキシ化合物との 1 段反応によって、リジン残基などがヒドロキシアシル化された。本修飾により（中性をまたがる広い pH 領域で）水溶性たん白質に変換された。
2. 塩化チオニルとアルコールの組み合わせで SPI のグルタミン酸、アスパラギン酸のほぼ全カルボン酸基をメチルおよびエチルエステル化することができた。SPI の物性への影響は顕著であり、カチオン性高分子へと電荷が反転するとともに冷水にも可溶となるなど劇的な変化が見られた。

文 献

- 1) 矢野 勲(1977): エビ, カニ類の外皮の構造と形成. 化学と生物, **15**, 328-336.
- 2) Ritter SK (1997): *Boning Up. C & EN*, August 25, pp. 27-32.
- 3) Ishaug-Riley SL, Crane G, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ and Mikos AG (1998): Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) forms implanted into the rat mesentery. *J Biom Mat Res*, **33**, 1-8.
- 4) 妹尾 学, 大坪 修(1988): 複合材料. 新医療材料開発利用便覧, R&D プランニング, pp. 330-338.
- 5) 豊田春和, 長南康正 (1984): コラーゲン及びゼラチンの化学修飾. 皮革化学, **30**, 3-21.
- 6) Meyer EW and Williams LD (1976): Chemical modification of soy proteins, *In : Food Proteins*. Kinsell, JE ed., American Oil Chemists Society, pp. 56-66.
- 7) 山内文夫 (1980): 食品タンパク質の科学—大豆タンパク質の構造と機能特性. *New Food Industry*, **22**, 26-44.
- 8) 山内 清 (1997): 大豆たん白質の化学修飾—化学的ケラチン化と高分子材料としての機能に関する研究. 大豆たん白質研究会誌, **18**, 25-30.
- 9) 山内 清 (1994): 髪, 羊毛を溶かす—ケラチン高分子. 高分子加工, **43**, 14-19.
- 10) Yamauchi K, Yamauchi A, Kusunoki T, Khoda A and Konishi Y (1996): Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. *J Biom Mat Res*, **31**, 439-444.
- 11) Yamauchi K and Khoda A (1997): Novel proteinous microcapsules from wool keratins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **9**, 117-119.
- 12) Morrison RT and Boyd RN (1992): *Organic Chemistry*, 6th ed., Prentice Hall International, pp. 481-487.
- 13) Fraenkel-Conrat H and Olcott H (1945): Esterification of proteins by alcohols of low molecular weight. *J Biol Chem*, **161**, 259-268.