

# 転移酵素を用いた大豆たん白質へのデキストランの導入による可溶化

川喜田英孝\*

佐賀大学大学院工学系研究科

## Solubilization and Stabilization of Dextran-Introduced Soy Protein Isolate by Transferase Reaction

Hidetaka KAWAKITA

Department of Applied Chemistry, Saga University, Saga 840-8502

### ABSTRACT

Dextranase is immobilized on the surface of soy protein isolate (SPI) via electrostatic interaction. In reacting with sucrose, dextran is generated from the immobilized DSase. Dextran-generated SPI had higher stability and viscosity in solution, demonstrating that water molecules coordinated with the generated dextran. Using the enzymatic reaction, a novel method to modify surface of a biocolloid such as SPI was developed. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 145-148, 2010.

Key words : dextranase, SPI, dextran viscosity

大豆たん白質は、食品材料としてだけでなく、医療材料あるいは素子としても注目されているたん白質である。それは、大豆から粗抽出など様々な行程を経て得られるたん白質であり、その性質も多様である。その大豆たん白質には、水に不溶性成分と可溶性成分に分類される。大豆たん白質のような不溶性たん白質を水に可溶化あるいは水中でコロイド状態で安定化する技術の確立は、食品あるいは医療素子としての利用へと繋がる。

不溶性大豆たん白質への水中への可溶化/安定化戦略として、大豆たん白質の表面に水和性の高い分子であるポリエチレングリコールなどの導入を考えた (Fig. 1)。すなわち、親水基が大豆たん白質に導入さ

れると、水分子が導入された親水基に配位するために、コロイド状態で安定化し、さらに水分子の配位が促進されると可溶化できる。

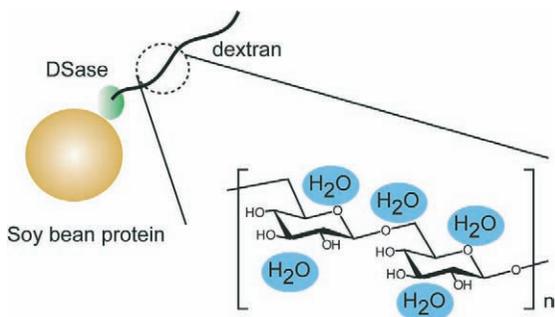


Fig. 1. Dextran formation on the surface of insoluble soy bean protein via transferase reaction.

\*〒840-8502 佐賀市本庄町1

我々はこれまで、転移酵素であるデキストランシクラーゼ (DSase) を用いた膜担体表面へのデキストランの導入の研究を行ってきた。デキストランは、グルコースが  $\alpha$ -(1, 6) 結合した高分子であり、ランダムな構造をもち水への溶解性が他の多糖と比較して高い。DSaseと、基質であるショ糖とを反応させると、生成物であるデキストランと副生成物であるフルクトースを生成する。デキストランとDSaseは、DSaseの活性中心で弱い相互作用で結合している。この性質を利用して、DSaseを無機多孔性膜の孔表面に固定した後にショ糖溶液を透過するとDSaseの活性中心からデキストランを生成することができた。この方法によって、多孔性膜の孔をデキストランによって占有して膜の空孔率を変化させる方法<sup>1,2)</sup>、生成したデキストランによるコロイド粒子の除去<sup>3,4)</sup>、あるいはデキストランのレクチン分子の吸着場<sup>5)</sup>として利用してきた。

本研究では、転移酵素であるDSaseの特性を利用して、大豆たん白質の表面にデキストランを生成させて、可溶化/安定化を目指した改質方法を提案する。水に不溶性の大豆たん白質の表面にDSaseを固定する。そして、ショ糖溶液と反応させて、たん白質表面に固定されたDSaseの活性中心からデキストランを生成させた。改質した大豆たん白質を分散させた溶液の粘度特性を音叉型粘度計を用いて評価し、転移酵素で生成したデキストランによって改質した大豆たん白質の特性を調べた。

## 実験方法

### 試薬

デキストランシクラーゼ (DSase) は、Sigma Co.製 (lot: 018K4014) を使用した。ショ糖は、和光純薬工業株式会社製を使用した。Bradford試薬は、Sigma Co.製を用いた。不溶性たん白質として、不二製油株式会社からいただいたフジプロFを用いた。その他の試薬は、すべて特級以上を使用した。

### フジプロFの精製

水への不溶成分の大豆たん白質を使用するために、フジプロFを精製した。pH 7.0, 10 mMリン酸緩衝液 (200 mL) にフジプロF 10 gを投入し、24時間、室温で攪拌を行った。その後、遠心分離処理 (Tomy MX-301, 1,500 G, 5分間, 室温) を行い沈降した不溶成分を回収した。上澄み液中のたん白質濃度を、牛血清アルブミンを検量線としてBradford法を用いて算出した。

### 不溶性大豆たん白質表面へのデキストランの生成

DSase 5 mL (1 U/mL) に調製し、これとフジプロF 1.0 g, および14 mL リン酸緩衝液 (pH 7.0, 10 mM) を混合させた。30°Cで1時間接触後、遠心分離によって固液分離を行い、DSaseが固定されたフジプロFを回収した。酵素の固定量は、酵素の活性値から算出した。

酵素を固定した不溶性フジプロFに25 g/L ショ糖溶液 (pH 7.0, 10 mM リン酸緩衝液) 50 mLを接触させ24時間、30°Cで反応させた。反応後遠心分離を用いて固液分離を行い、デキストラン生成フジプロFを回収した。デキストランの生成量は副生成物であるフルクトースの濃度を高速液体クロマトグラフィー (Pump: 515 HPLC pump Waters Corp., detector: 2414 refractive index detector, Column: Amide-80, Tosoh Corp., elution: 8:2 acetone: water, flow rate 1.0 mL/min) によって測定した。

### デキストラン生成大豆たん白質の性状

デキストラン生成大豆たん白質を水に分散させ、その状態を観察した。また、デキストラン生成に伴う不溶性大豆たん白質の粘度評価を、濃度30 g/Lに設定し、音叉振動式 (SV型) 粘度計 (AND, SV-1A) を用いて評価した。

## 結果と考察

### デキストラン生成不溶性大豆たん白質の調製

DSaseを大豆たん白質に1時間固定させ、遠心分離後上清の酵素残濃度を、酵素反応を行って調べた。すると、酵素反応は起こらず、すべてのDSaseがフジプロFに固定されたことがわかった。酵素の固定量は、フジプロF 1 g当たり5 Uであった。酵素を固定しても、目視ではその状態に変化は存在しなかった。

DSaseが固定された大豆たん白質とショ糖溶液を接触させて、固定されたDSaseの活性中心から大豆たん白質の表面にデキストランを形成させた。24時間後、副生成物であるフルクトースの濃度からデキストランの生成量を算出すると、大豆たん白質1 g当たり0.02 gのデキストランが生成していた。

生成したデキストランの分子量を直接測定することは困難である。そのため、遊離 (均一系) でDSaseとショ糖が反応して生成したデキストランの分子量から推算することとした。サイズ排除クロマトグラフィーによって、均一系の反応で生成したデキストランの分子量を測定すると、2,000 kDa以上の分子量であった。従って、大豆たん白質表面に形成されたデキストラン

は巨大な高分子であると推察される。大豆たん白質表面に固定されたDSaseの固定サイトを特定することは困難である。DSaseが大豆たん白質に特異的に固定されるのであれば、大豆たん白質の特定の部位からデキストランを成長できる可能性がある。

#### デキストラン生成不溶性大豆たん白質の観察

デキストラン生成不溶性大豆たん白質を純水 (pH 5.8) に30 g/Lの濃度で混合し、観察した (Fig. 2)。大豆たん白質のみの場合には白色の半透明であった。しかしながら、デキストランが生成した場合には、白色に茶色がかった。デキストランが生成した大豆たん白質は水中で安定化して存在していた。すなわち、分散性が大豆たん白質よりも高かった。これは、生成したデキストランに水分子が配位し、大豆たん白質—デキストラン複合体の親水性が増加したためである。

#### デキストラン生成不溶性大豆たん白質の粘度特性

大豆たん白質およびデキストラン生成不溶性大豆たん白質を純水に分散させ、粘度特性を評価した (Fig. 3)。比較のために、デキストラン (2,000 kDa以上, Sigma Co.) を0.01 g/L添加した溶液とデキストラン生成不溶性大豆たん白質を混合した溶液についても粘度特性を評価した。その結果、デキストランを酵素反応で生成させた大豆たん白質が最も高い粘度特性を発現した。これは、生成したデキストラン同士が親水的に接触し、またデキストランに配位した水分子によって高い粘度特性が発現したと推察される。

## 結 言

不溶性大豆たん白質 (フジプロF) の表面に、デキストランシュクラーゼを固定した。そして、ショ糖と反応させてDSaseの活性中心からデキストランを生成させた。デキストランを生成させると、大豆たん白質の水中の安定性が増加し、また粘度も高い値を示した。酵素反応を用いて大豆たん白質の様な生体コロイド表面に糖類を形成する、新規な手法を開発できた。

## 要 約

大豆たん白質の表面にデキストランシュクラーゼ (DSase) を静電的な相互作用で固定した。そして、ショ糖と反応することで、固定されたDSaseの活性中心からデキストランを生成させた。デキストランを生成させた大豆たん白質は、水中で高いコロイド安定性および高い粘度特性を発現した。これは、水分子がデキストランに配位したためである。転移酵素の反応を利用することで、大豆たん白質表面を改質することができ、水への安定性を向上することができた。

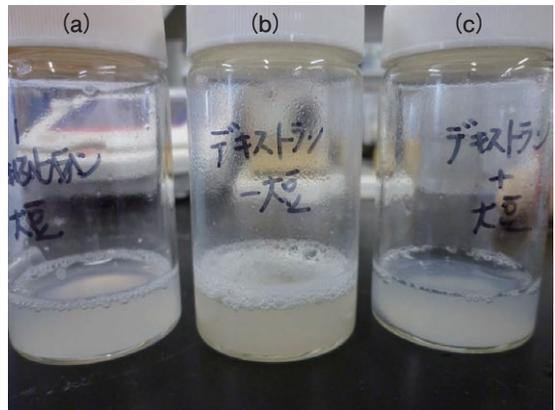


Fig. 2. Images of dextran-formed SPI in the solution (a) SPI only, (b) dextran-formed SPI, and (c) SPI + dextran.

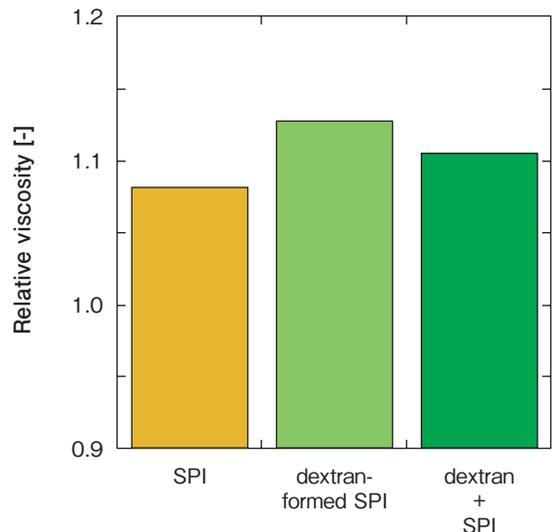


Fig. 3. Comparison of viscosity (Conc., 30 g/L, temp., 56°C).

## 文 献

- 1) Seto H, Kawakita H, Ohto K, Harada H and Inoue K (2007): Membrane porosity control with dextran produced by immobilized dextransucrase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82**, 248-252.
- 2) Kawakita H, Hamamoto K, Seto H, Ohto K, Harada H and Inoue K (2009): Porosity estimation of a membrane filled with dextran produced by immobilized dextransucrase. *AIChE J.* **55**, 275-278.
- 3) Kawakita H, Seto H, Ohto K, Inoue K and Harada H (2007) : Pores control with dextran generated from immobilized dextransucrase. *Biochem. Eng. J.*, **36**, 190-193.
- 4) Kawakita H, Yoshimura Y, Hamamoto K, Seto H, Ohto K, Harada H and Inoue K (2009): Dynamic rejection of colloidal particles with generating dextran by enzymatic reaction. *J. Chromatogr. B* **877**, 347-350.
- 5) Kawakita H, Hamamoto K, Seto H, Ohto K, Harada H and Inoue K (2007): Bioseparation of lectin by dextran produced by dextransucrase. *J. Ion Exch.* **18**, 324-327.