

配位能力の高い単糖によって水和性が向上された 不溶性大豆たん白質由来ゲルの調製と分離材料への応用

高田諒太・瀬戸弘一・大渡啓介・川喜田英孝*

佐賀大学大学院工学系研究科循環物質化学専攻化学工学研究室

Preparation of Insoluble Soy Protein Gel Enhancing Hydration with Monosaccharide as a Separation Material

Ryota TAKATA, Hirokazu SETO, Keisuke OHTO and Hidetaka KAWAKITA*

Department of Chemistry and Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering,
Saga University, Saga 840-8502

ABSTRACT

Insoluble soy protein (Fuji Pro F) was reacted with keto glucose for crosslinking the inter-proteins by glutaraldehyde to obtain a soy protein gel. Keto glucose-introduced gel represented the roughness on the surface, resulting in a more heterogeneous gel. However, keto glucose-introduced gel had the most swelling when immersed in water and acetone alternatively. After the adsorption of phloxine and hemoglobin, phloxine had the more effective desorption in acetone solution. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 145-150, 2012.

Key words : separation, gel, soy protein, keto glucose

ゲルは「あらゆる溶媒に不溶の三次元網目構造をもつ高分子およびその膨潤体」と定義されている。ゲルは三次元網目構造もつ架橋高分子であり、溶媒との相互作用によって膨潤し、かつ架橋構造のために有限の膨潤性を示す。また多量の溶媒を吸収した膨潤ゲルは固体と液体の中間の物質形態であり、その化学組成や種々の要因によって粘性の液体からかなり硬い固体にまで変化する。それにより、ゲルは固体、液体および気体という一般的な物質の状態と異なる特殊な形態で存在である。さらに、架橋構造の生成は化学反応によるものだけではなく、異なる高分子鎖の特定の単位間

の水素結合や配位結合のような二次結合によっても可能である。これらの特性からゲルは様々な分野で利用されている。

たん白質ゲルは、たん白質を均一な溶液に溶解させ、その後、分子間を共有結合で架橋して調製されることが多い。調製の方法を変化させると、ミクロゲルを形成し、微小な空間で応答する、あるいは薬物を放出するなどの特徴を持つ。不溶性のたん白質の場合は、たん白質内に存在するアミノ酸残基が疎水基を多数持つためにたん白質周りに完全な水和構造が形成されない。そのため、この不溶性ゲルを化学架橋すると、架橋の分布によってマクロなドメインが形成され、不均一なゲルとなる。構造が不均一なゲルは、高分子から

*〒840-8502 佐賀市本庄町1

なる複数の性質をもつ部分をもっていると考えることができる。いわば、複数の機能をもつこととなる。そのため、均一なたん白質から調製したゲルが持たないような新規な性能の発現が期待できる。例えば、ゲル内部に複数のドメインをもつために、溶媒に浸漬すると、たん白質ゲル内部の溶媒和挙動が変化し、伸縮挙動が変化する。

グルコースは分子内に複数の水酸基をもつために、高い親水性をもつ。また、分子内に還元部位であるアルデヒド部位をもつために、たん白質と化学的な結合をメイラード反応によって形成させ、糖結合性たん白質を合成する研究が以前から行われてきた^{1,2)}。このグルコースの導入により、たん白質の周りに水酸基由来の水和構造が形成され、糖結合型たん白質自体が高い水溶解性をもつようになる。メイラード反応による糖の導入は、糖の持つアルデヒド部位が大きな役割を果たす。もし、複数の反応性の高いアルデヒドあるいはケトンを経骨格に導入できれば、さらに高効率で糖結合性たん白質を合成できる。

グルコースにケトン基を導入する方法には、化学法あるいは酵素法がある。酵素として、ピラノース 2-オキシダーゼを用いると、選択的にグルコースの C2 位にカルボニル基を導入できる。瀬戸らは、カルボニル基が導入されたグルコース（ケトグルコース）が、濃度を増加させるとカルボニル基由来の水素結合を形成するために、グルコースと比較して高い粘度を示すことを明らかにした³⁾。ケトグルコースは、遊離状態で還元部位および導入されたカルボニル部位という二つの活性部位をもつためである。メイラード反応は、たん白質および糖を高温で接触させるために、たん白質の構造変化を誘発する可能性がある。ケトグルコースとたん白質を接触させると、常温でも糖結合型たん白質を調製できる可能性がある。これは、C2 位にカルボニル基が導入されたグルコースは、溶液中で α -ジケトン形成するために、C1 位のアルデヒドの反応性が向上し、常温でのたん白質への配位が可能になる。

大豆たん白質は、ゲル化および乳化などの機能性をもち食品添加物として食品産業で用いられている。大豆たん白質の一次構造には、体内で作ることができない必須アミノ酸を多く含み、栄養価に優れており、健康の観点からも注目されている。このたん白質は、水中に分散させると、不均一となり水への溶解性は低い。すなわち、分子の長さが長く、かつ疎水性部位を高密度に含むために、水に分散させても水和構造を形成できていない。グルコース分子を大豆たん白質表面に効

率的に導入し、それをゲル化すると、グルコース由来の水和構造を持ちながら、かつ不均一な構造をゲル内部に形成できる。そのゲルのマクロな不均一構造とグルコースによる水和構造が、新たな大豆たん白質食品の機能発現につながる可能性がある。また、分離素材としても魅力的な構造をとる。マクロなゲル構造、およびゲルを構成する分子によるミクロな吸着サイトによって、新規な分離素材の可能性ももつ。

本研究では、水に不溶な大豆たん白質（フジプロ F、不二製油株式会社製）にカルボニル基が導入されたグルコースを常温で導入し、その後化学架橋を行う。大豆たん白質中に存在するアミノ酸残基中のアミノ基は、ケトグルコースと反応して糖と結合する。その後、大豆たん白質中に残存しているアミノ基同士が化学的に架橋されるために、ゲル内部に不均一構造をもつ糖結合型たん白質が調製される。本研究では、以下の 4 点を目的とする。1) P2Ox によってグルコースの C2 位にカルボニル基が導入されたグルコース（ケトグルコース）を合成した。2) 構造を柔軟にした大豆たん白質と常温で接触させ、大豆たん白質の表面に水和構造を形成し、その後グルタルアルデヒドによって大豆たん白質を化学架橋した。3) アセトンおよびエタノールによる溶媒応答性、および顕微鏡観察によって、大豆たん白質の不均一な構造の形成について、グルコースの場合と比較して考察した。さらに、4) 分子量の異なるフロキシシンおよびヘモグロビンを用いて、ゲル内部への取り込みおよび吐き出しを溶媒によるゲルの構造変化によって実現することを試みた。溶媒に溶解しない不均一なたん白質と水和構造を導入するケトグルコースとをゲル内で合一化した不均一ゲルの形成を検証し、分離材料としての可能性を検証した。

方 法

試薬

大豆たん白質は、不二製油株式会社から頂いたフジプロ F を使用した。ピラノース 2-オキシダーゼ（P2Ox）およびカタラーゼは、Sigma から購入した。グルタルアルデヒドは、和光純薬製を用いた。限外ろ過膜（Cut off 10 kDa, 47 mm）は、Millipores 製を使用した。その他の試薬は、特級以上を用いた。

大豆たん白質ゲルの調製

P2Ox を用いたグルコースへの C2 位へのカルボニル基の導入は既報に従って行った。P2Ox 10 mg およびカタラーゼ 50 μ L とグルコースを純水中で反応させ

た。ここで、カタラーゼは、生成する過酸化水素を水に変換するために使用した。反応には酸素が必要なために、空気をポンプで送った。生成物であるケトグルコースの濃度は、高速液体クロマトグラフィー (column: TSK Amide-80, Tosoh Co., pump: 515 HPLC Pump-Waters Co., detector: 2414 refractive index detector-Waters Co., recorder: C-R8A Chromatopac, Shimadzu Corp., mobile phase: water: acetonitrile=2:8, flow rate: 1.0 mL/min) で検出した。反応後、限外ろ過膜で酵素を除去し、凍結乾燥によって粉末状のケトグルコースを得た。

フジプロF 4.5 gに蒸留水50 mLを加え、質量濃度 90 g/Lの大豆たん白質溶液を調製した。pHは、1.0 M NaOHを用いて9.0に設定した。その後、大豆たん白質が分散した溶液を378 Kになるまで加熱還流しながら30分間攪拌し、その後常温になるまで放置した。グルコースおよびケトグルコースを0.5 g加えた後に、323 Kで12時間攪拌した。再度pHを1.0 M NaOHを用いた5 wt%グルタルアルデヒド溶液を10 mL加え2調整し、24時間常温で放置した。合成された糖結合型たん白質ゲルを蒸留水によって数回洗浄して3種類の大豆たん白質ゲル (大豆たん白質ゲル、グルコース結合型大豆たん白質ゲル、およびケトグルコース結合型大豆たん白質ゲル) を得た。

各溶媒ごとの大豆たん白質ゲルの膨潤度の測定

大豆たん白質ゲルをwetな状態で0.5 gをマイクロチューブに入れ、ゲル相の高さを測定した。純水、エタノール、およびアセトンに1.0 mL加え、十分攪拌後、遠心分離機によって (時間: 10分, 6,200 rpm, チビタン) を用いて液体とゲルを分離した。ゲル相の高さを測定し、最初の高さとの比率を膨潤度を時間の経過とともに算出した。この操作を5回行い、平均値を算出した。

ゲルによる有機化合物の取り込みおよび吐き出し

2.0 mLマイクロチューブに各ゲル (たん白質ゲル、グルコース糖たん白質ゲル、ケトグルコース糖たん白質ゲル) を0.5 g入れた。1.0 g/Lのフロキシシ溶液 (solvent: water) を0.5 mL加え攪拌後、遠心分離機 (time: 10 min, 6,200 rpm) によって液相とゲル相に分離し、液相を採取した。アセトン1.0 mLを加え攪拌後、遠心分離機 (time: 10 min, 6,200 rpm) によって液相とゲル相に分離し、液相を採取した。採取した液相を任意の倍率に希釈した後、紫外可視分光光度計 (UV-VIS U-3310) により540 nmの波長の吸光度から濃度を算出した。

結果と考察

不均一な大豆たん白質ゲルの調製

大豆たん白質は、食品素材として広く利用されている。大豆たん白質の一つであるフジプロFは溶液中に分散させると、溶解することなく不均一になる。すなわち、水和性をもつアミノ酸残基由来の官能基部位と、疎水性の部位が大豆たん白質の構造内部に存在し、疎水部位が支配的であるために、溶解しない。この大豆たん白質に糖分子を導入すると、糖分子のもつ複数の水酸基によって水和構造が形成される可能性がある。カルボニル基を導入したグルコースを大豆たん白質に常温で導入し、さらにグルタルアルデヒドによって大豆たん白質間を架橋し、糖が結合した不均一大豆たん白質ゲルの形成を狙っている。ここで、糖が結合する部位は、大豆たん白質を形成するアミノ酸残基のアミノ基である。また、グルタルアルデヒドが大豆たん白質分子間を架橋する部位もアミノ基である。そのため、糖分子が導入されると、架橋のために残されたアミノ酸残基中のアミノ基の濃度が減少するために、グルタルアルデヒドによる架橋ができない。

2種類の酵素を用いて、グルコースにカルボニル基を導入した。24時間の反応時間を経過させると、100%の転化率となることが明らかになり、既報の結果と一致した⁴⁾。グルコースおよび合成したケトグルコースを、大豆たん白質に導入した。大豆たん白質ゲル、グルコース導入大豆たん白質ゲル、およびケトグルコース導入大豆たん白質ゲルの写真をFig. 1に示す。大豆たん白質ゲルおよびグルコース導入型大豆たん白質ゲルの表面は、スムーズであった。しかしながら、ケトグルコースを導入した大豆たん白質ゲルの表面の構造は、他の2種類の表面とは異なり、凸凹であった。

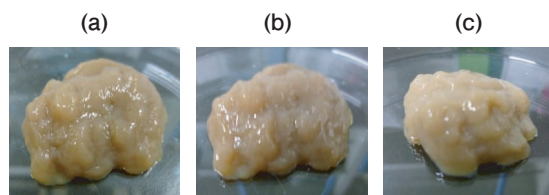


Fig. 1. Images of the prepared gel. (a) soy protein gel, (b) glucose-introduced soy protein gel and (c) keto glucose-introduced soy protein gel.

これは、ケトグルコース導入型糖を導入した大豆たん白質ゲルは、構造が不均一なためである。ケトグルコースは、溶液中でアルデヒドおよびケトンをもつ。ケトンによって、アルデヒド部位が活性化し、たん白質中のアミノ基と結合する。その後、グルタルアルデヒドによって架橋をしても、残存しているたん白質中のアミノ基が存在していないために、架橋構造がたん白質内部で均一に形成することが困難である。一方、グルコースの場合は、ほとんど大豆たん白質のアミノ基と反応しないために、グルタルアルデヒドのためのアミノ基という架橋部位が残存しており、不均一ながらも大豆たん白質ゲルを形成できると推察される。

溶媒変化によるゲルの体積変動

調製した3種類の大豆たん白質ゲルを、水、エタノール、およびアセトンに浸漬した。このときの体積変化の経時変化をFig. 2に示す。水に浸漬した場合には、時間の経過とともに、3種類のゲルは徐々に膨潤し、やがて一定に成った。すなわち、3種類のゲルはいずれも水和性をもつ構造が維持されており、グルコースあるいはケトグルコースの導入によって大豆たん白質の膨潤性は変化しない。一方、エタノールおよびアセトンに浸漬した場合には、溶媒によって脱水が起こり、徐々に体積が縮小した。縮小の場合にも、糖による劇的な効果は出なかった。

水と、エタノールおよびアセトンに交互に浸漬した場合の大豆たん白質ゲルの体積変化についてFig. 3に示す。いずれの溶媒に水と交互に浸漬した場合にも、

体積変化率が少しずつ増加することがわかった。水およびエタノールに交互に浸漬した場合には、3種類の大豆たん白質ゲルはほぼ同一の挙動をみせた。一方、水およびアセトンに交互に浸漬した場合には、ケトグルコース導入型大豆たん白質ゲルが、他の2種類のゲルと比較して膨潤率の変化が大きくなった。これは、アセトンの内部への拡散が大きく影響しているためである。ケトグルコース導入型大豆たん白質ゲルは、構造内部に不均一な部位をもつためにアセトン中の浸漬によってより敏感に脱水が起こったと推察される。

フロキシソおよびヘモグロビンのゲルによる取り込みおよび吐き出し

フロキシソおよびヘモグロビンの各ゲルの溶媒ごとの有機化合物の取り込み率をFig. 4に示す。水溶媒中ではどちらも取り込み率に違いが見られない。しかしながら、アセトンを用いてゲルを収縮させると、フロキシソは放出されるのに対してヘモグロビンはゲルに保持されたままであった。これはヘモグロビンの分子量（約64,500 g/mol）に対してフロキシソの分子量（829 g/mol）は非常に小さいためである。アセトンによってゲルが収縮する際に、分子径が大きいヘモグロビンはゲルの空隙に取り込まれやすく、分子径が小さいフロキシソはゲルの空隙に取り込まれにくい。つまり、ゲルを構成している高分子鎖が収縮する際に分子径が大きいヘモグロビンは、高分子鎖に物理的に絡めとられゲル中に保持されて、分子のサイズによる排除効果を得る。

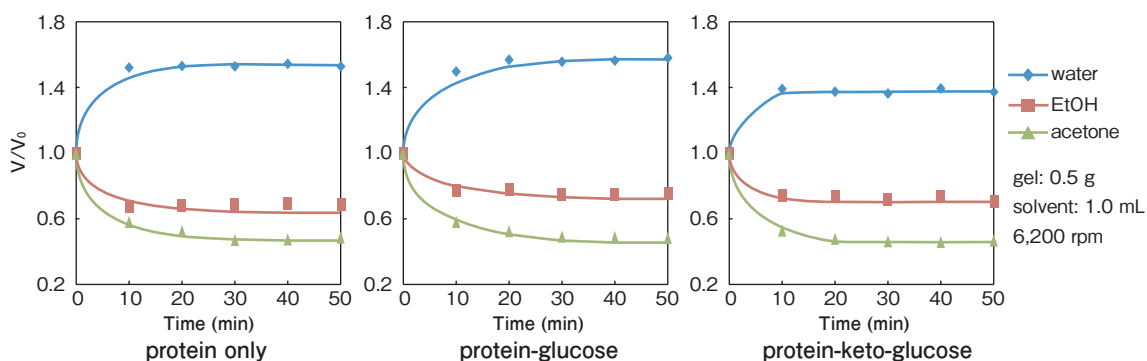


Fig. 2. Time course of volume change of (a) soy protein gel, (b) glucose-introduced soy protein gel and (c) keto glucose-introduced soy protein gel.

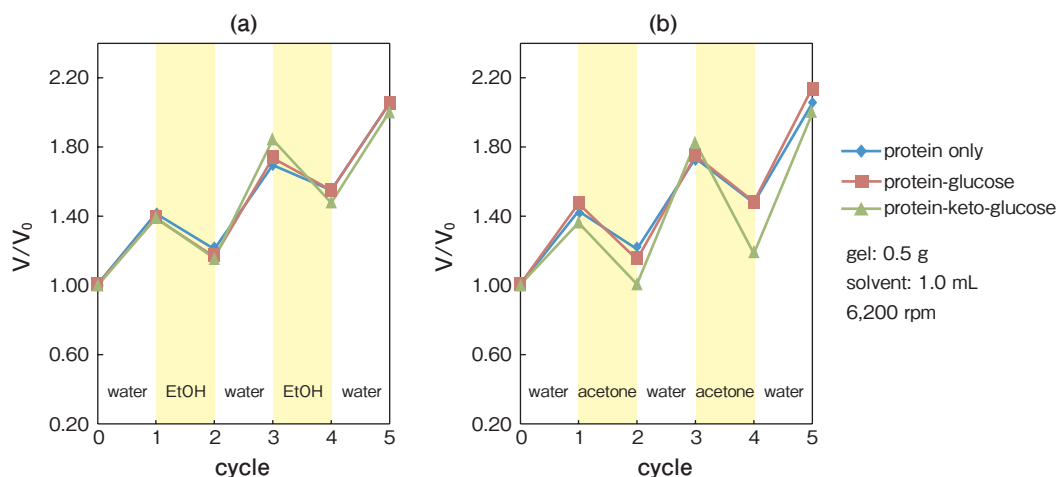


Fig. 3. Volume change for cycle immersion (a) water and ethanol and (b) water and acetone.

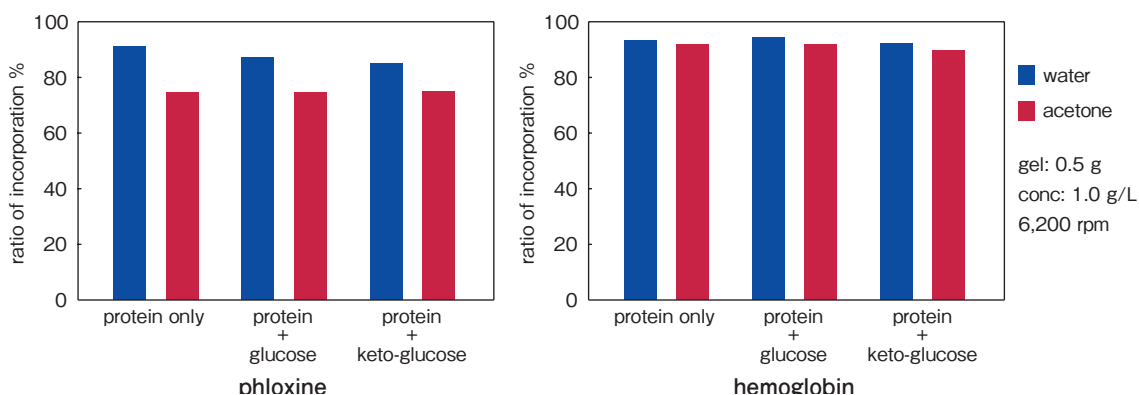


Fig. 4. Adsorption and desorption of phloxine and hemoglobin in immersing in water and acetone alternatively.

要 約

大豆たん白質（フジプロF）とケトグルコースを反応させた後に、グルタルアルデヒドで大豆たん白質分子間を架橋して、ゲルを調製した。大豆たん白質のアミノ基は、グルコースと比較してケトグルコースと高い反応性を示すと推察される。そのため、グルタルアルデヒドで架橋すると、ケトグルコースを導入した大豆たん白質は、架橋部位と架橋されていない部位が存在するために、不均一なゲルとなった。表面観察および溶媒による体積変化の応答性からも、その不均一性は支持された。溶媒を変化させて、分子を変化させてゲルによる取り込みと吐き出しを行った。分子のサイズが異なるために、それに伴い、分子の特に吐き出し能が変化した。大豆たん白質は通常食品素材として利用される。糖が導入された大豆たん白質は、食品分野だけでなく、ゲルとして分離材料としての利用が期待できる。

文 献

- 1) Ames J M (1990): Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends Food Sci and Technol*, **1**, 150-154.
- 2) Visschers R W and Jongh H H J (2005): Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnol Adv*, **23**, 75-80.
- 3) Seto H, Ohto K, Harada H, Takisawa N and Kawakita H (2010): Rheological properties of keto-sugars with high-density carbonyl groups. *Carbohydr Polym*, **80**, 1183-1188.
- 4) Seto H, Kawakita H, Ohto K, Harada H and Inoue K (2008): Novel carbonyl-group-containing dextran synthesis by pyranose-2-oxidase and dextransucrase. *Carbohydr Res*, **343**, 2417-2421.