

## 大豆たん白質抗酸化機能の改善とその利用

### FURTHER IMPROVEMENT IN FUNCTION OF SOY PROTEIN AS ANTIOXIDANT AND ITS APPLICATION TO PREVENTION OF LINOLENATE PEROXIDATION

伊吹文男・島戸はるみ・岩見公和（京都府立大学農学部）

Fumio IBUKI, Harumi SHIMATO and Kimikazu IWAMI

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

#### ABSTRACT

ASF was prepared from DSM or SPI with or without additional lipid removal by chloroform-methanol (2:1) extraction and examined for antioxidative effect against linolenate peroxidation in a powder model system at a fixed temperature (37°C) and varied water activities ( $A_w=0.25, 0.55, \text{ and } 0.75$ ). The pretreatment of DSM with chloroform-methanol (2:1) mixture prior to ASF preparation caused a slight decrease in the antioxidant effect. In relation to this effect, ASF from SPI was somewhat superior to that from DSM. As an attempt to raise the function of SPI as antioxidant, linolenic acid was embedded in the acid-precipitated protein particles. Although the amount of linolenate embedded herein was no more than 15% of the initial administration, the fatty acid was stable against oxidation over a month at different  $A_w$ s. Taking into consideration further improvements in the incorporation efficiency of polyunsaturated fatty acid, this is a practical and convenient means to enable food protein to function as prominent antioxidant. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **10**, 23-27, 1989.

Abbreviation: ASF, acid-sensitive fraction; DSM, defatted soybean meal; SPI, soy protein isolate,  $A_w$ , water activity.

近年、多価不飽和脂肪酸の栄養問題が多くに関心を集めている。魚油に含まれるエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸の生理作用については、その長期間持続摂取が血栓症や動脈硬化の予防に有効であることはよく知られているが<sup>1)</sup>、摂取脂肪中の不飽和/飽和脂肪酸比や不飽和酸中の  $n-3/n-6$  比の重要性も幼動物脳発達段階における脳神経系の働きとの関連で再認識されつつある<sup>2,3)</sup>。しかし、多価不飽和脂肪酸含量の高い食品は酸化的劣化をうけ易く、酸化反応の進行は食品価値を損なうだけでなく他の必須栄養素を破壊し、甚だしきは毒性を生ぜしめる<sup>4)</sup>。従って多価不飽和脂肪酸を有効かつ安全に利用するためには、効果的な酸化防止対策が講じられなければならない。

一般に不飽和度のきわめて高い脂肪酸の取扱いでは、

たん白質や多糖との粉末状態として保存する方が安全で便利ことが多い。その支持体候補として有望な食品たん白質には、両親媒性の故に多かれ少なかれ何らかの抗酸化機能が潜められている<sup>5,6)</sup>。

本研究は、多価不飽和脂肪酸中、リノール酸よりさらに不飽和度の高いリノレン酸の酸化防止に対して、大豆たん白質を素材とした場合に如何にすればその潜在的能力を最大限に発揮させうるかについて、新たな視点に立って再検討を加えたものである。

#### 実験方法

##### 試料調製

この研究で用いた脱脂大豆(defatted soybean meal, 以下 DSM)及び分離大豆たん白質(soy protein isolate,

以下 SPI) は不二製油㈱研究所より、 $\alpha$ -リノレン酸 (純度75%, 他にリノール酸22%, オレイン酸3%を含む) は日本油脂㈱尼崎工場より供与をうけた。DSM と SPI の更なる脱脂にはクロロホルム-メタノール (2:1) を用い、抽出洗浄後の残渣から風乾により有機溶媒を蒸散させた。酸感受性画分 (acid-sensitive fraction, 以下 ASF) は、山内ら<sup>7)</sup>の方法を一部改変し、Scheme の順序に従って調製した。すなわち DSM または SPI を10倍容の pH 8~9 の水と共に一夜攪拌し、その遠心分離後の上清を pH 4.5 として 4℃ に一夜放置、沈殿する画分を 1 M 塩化ナトリウムで洗浄、凍結乾燥後の粉末を当該標品とした。 $\alpha$ -リノレン酸を包含した大豆たん白質またはミルクカゼインの酸沈澱標品は、ASF 調製法に準じて10倍容の微アルカリ水抽出液 (pH<9) に元のたん白質に対して1/10相当量の  $\alpha$ -リノレン酸-パルミチン酸 (2:1) 混合脂肪酸の石ケン水を加えてよく分散し、溶液の pH を 4.5 に変えた後生ずる沈澱を分別、凍結乾燥後粉末化し、粒子表面に付着した脂肪酸を軽くヘキサン洗浄によって取除いたものである (脂肪酸含有率は約15%)。

#### 保存実験<sup>5)</sup>

各試料の粉末標品は、少量ずつ1.5 ml 容サンプルカップに分注し、濃度の異なる硫酸溶液で水分活性 ( $A_w$ ) を 0.35, 0.55, 0.75 に調整した恒温器 (37℃) 中の密栓容器内に保存した。実験中はときどき容器内空気の入換えを行なった。一定期間毎に所定容器を取り出し、サンプルカップ中の試料をまるごとクロロホルム-メタノール (2:1) で抽出後、濃縮、ヘキサン転溶、その一定量をロダン鉄法による過酸化

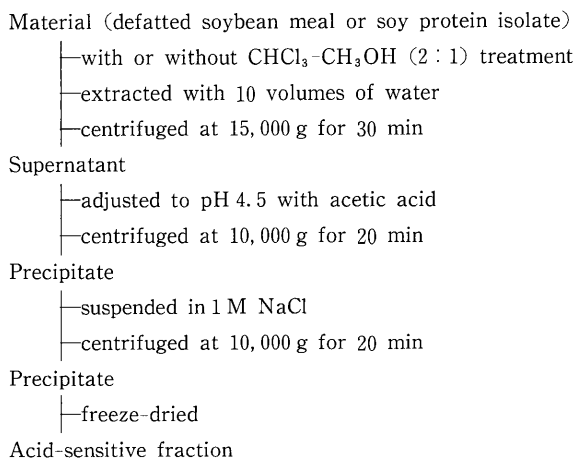
価の測定とガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析に供した。

#### ガスクロマトグラフィー

保存試料中のリノレン酸とパルミチン酸の残存比は、島津ガスクロマトグラフ GC-8A 型、DEGS+H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5+1%)/chromosorb W の 3 m キャピラリーカラムを用いる直接法によって両脂肪酸を分離し、得られたチャート上のピーク面積から同社製クロマトバック C-R1B を用いて算出した。

#### 結果と考察

Fig. 1 は DSM から調製した ASF 粉末とその1/10 量のリノール酸-パルミチン酸 (2:1) ヘキサン溶液とをよく攪拌混合の後、溶媒を揮散させたものを6週間、37℃ に3種の異なる水分活性でインキュベートし、その間に起こる不飽和/飽和脂肪酸比の変化を経時的に調べた結果である。ASF は比較的疎水性の高いたん白画分と定義され、たん白質粒子の空隙内部に多くの脂肪酸を取り込み、よって空気酸化に対し抵抗性を示すと期待される。事実、リノール酸に対してはそのような効果が認められた。これに対し、リノール酸より不飽和度が高く不安定なリノレン酸の、上と同じ条件での保存状態を調べたのが、Fig. 2 である。リノール酸の場合と違って3週目を経過する頃より急激な酸化の促進がみられ、低、中、高いずれの水分活性でも6週目には残存リノレン酸はほとんど消失していた。これには DSM に含まれる不飽和脂肪酸の関与も考えられたので、次にクロロホルム-メタノール (2:1) 抽出によって実験室的に脱脂処理を施した DSM から



Scheme for preparation of acid-sensitive fraction (ASF) from defatted soybean meal or soy protein isolate

調製した ASF の効果について調べた。

Fig. 3 はその結果を示したものである。水分活性の如何にかかわらずクロロホルム-メタノール (2:1) 処理によって、処理しないものより更に酸化促進時期の早まる傾向がみられた。この現象は、大豆中には天然抗酸化剤である数種類のフェノール系化合物が存在し<sup>8-10)</sup>、工場段階での脱脂操作によっても充分に取り除かれないので、今回の処理によってそれらの含量がさらに減少したため ASF の抗酸化性低下がもたされたと解釈できるかもしれない。

Fig. 4 はクロロホルム-メタノール (2:1) 洗浄後の SPI から調製した ASF の効果について調べた結果である。インキュベート開始 3、4 週後の本標品の抗酸化性は Fig. 3 より Fig. 2 の傾向とよく合致し、SPI の抗酸化効果は残留低分子性抗酸化物質の関与というより、たん白質そのものの作用による可能性の高いことが示唆された。しかし、ASF にはクロロホルム-メタノール (2:1) 洗浄によっても容易に除去されない不飽和脂肪酸が疎水性部分に強固に結合し、加えた脂肪酸を効率よく取り込めない場合も考えられる

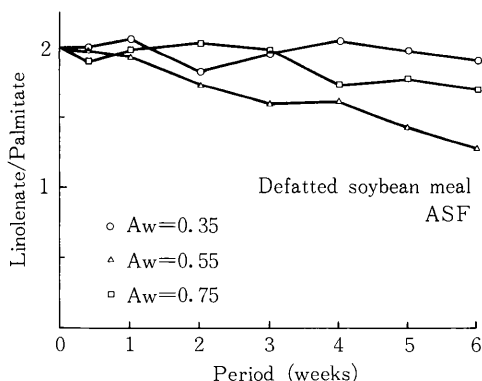


Fig. 1. Antioxidant effect of ASF from DSM on linoleate peroxidation. ASF was prepared from non-treated DSM by means of water extraction, acid precipitation, washing with NaCl and freeze-drying. A solution of linoleate-palmitate (2:1) mixture in hexane was dropwise added to ASF powders in the lipid/protein ratio of 1:10, followed by air-drying to obtain simple mixture specimens. The storage experiment was carried out in a powder model system at 37°C and different A<sub>w</sub>s. The ratio of unsaturated to saturated fatty acids was estimated by using a Shimadzu gas chromatograph equipped with Chromatopack.

ので、可溶化したたん白の酸沈澱回収前の溶液に不飽和脂肪酸を共存させ、酸沈澱形成時にたん白質粒子内部に取り込まれた脂肪酸が安定かどうか調べた。

Fig. 5 は未洗浄 DSM から調製した ASF のリノレン酸-パルミチン酸 (2:1) 単純混合標品と、脂肪酸共存下で DSM 抽出液から酸沈澱によって集めた凍結乾燥粉末標品 (ただしヘキサン洗浄) の低水分活性条件下における過酸化物質生成の程度を比較した結果である。単純混合標品では 3 週目に過酸化物質のピークがみられたが、酸沈澱標品にはほぼ 1 カ月間にわたって過酸化物質の増加が観察されなかった。この過酸化物質

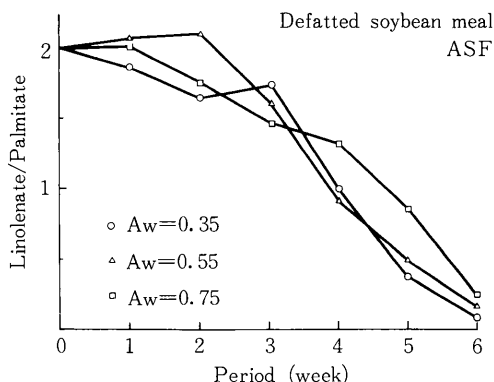


Fig. 2. Antioxidant effect of ASF from DSM on linolenate peroxidation. The experimental conditions were the same as in Fig. 1, except that linolenic acid was used instead of linoleic acid.

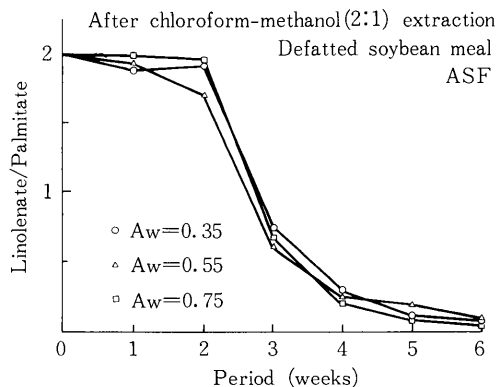


Fig. 3. Decrease in antioxidant effect of ASF from DSM by washing with chloroform-methanol (2:1) mixture. The experimental conditions were the same as in Fig. 2, except for chloroform-methanol (2:1) treatment before ASF preparation.

価にみられる挙動が残存リノレン酸／パルミチン酸比にも反映されているかどうかを調べたのが Fig. 6 である。測定誤差による多少のパラッキは認められるものの、リノレン酸は各水分活性条件下でほとんど酸化をうけず、安定な状態で保持されていることが確かめ

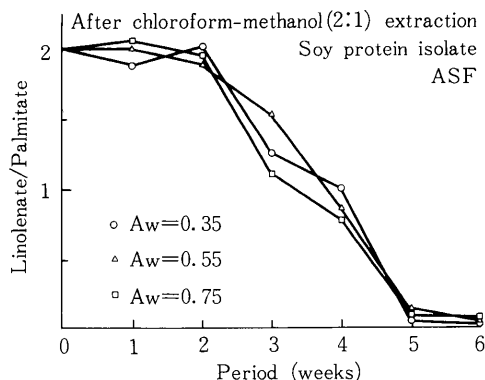


Fig. 4. Antioxidant effect of ASF from solvent-washed SPI on linolenate peroxidation. The experimental conditions were the same as in Fig. 3, except for replacement of DSM by SPI.

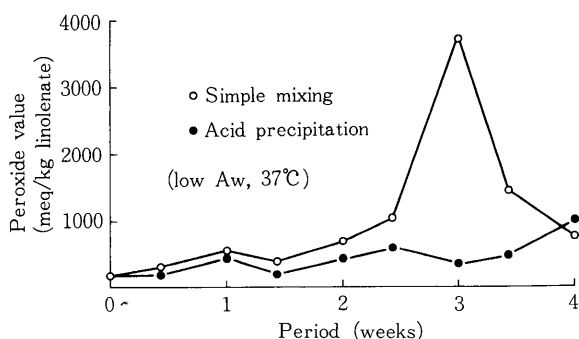


Fig. 5. Difference in hydroperoxide formation during incubation between simple mixture of linolenate with ASF and linolenate-embedded acid precipitate. SPI was used as starting material. The preparation procedures of ASF and simple mixture specimens were the same as above. Fatty acid-embedded proteins were obtained from pH 8 aqueous solution containing 10% SPI and 1% linolenate-palmitate (2:1) by acid precipitation with acetic acid. The precipitates were collected by centrifugation, freeze-dried and washed with hexane, followed by incubation in portions. The peroxide value was determined by the ferric thiocyanate method as usual.

られた。Fig. 7 は Fig. 6 と同じ操作を SPI について実施し、得られた標品の抗酸化性を調べた結果である。この場合もリノレン酸／パルミチン酸比はほぼ一定に保たれ、酸沈澱に際し共存脂肪酸の捕捉は部分的にしか達成されないものの、沈澱たん白質粒子表面に付着した不飽和脂肪酸を除いておけば、たん白質粒子内部に取り込まれた不飽和脂肪酸は低、中、高いずれの水分活性下でも安定に保存できることが確かめられた。

大豆たん白質の他、ミルクカゼインも同じような等電点を有し、遠心分離によって容易に酸沈澱カゼインを回収することができる。そこで上述の方法の応用がカゼインについても可能かどうか調べてみた。酸沈澱カゼイン粒子内部への脂肪酸捕捉効率率は、大豆たん白

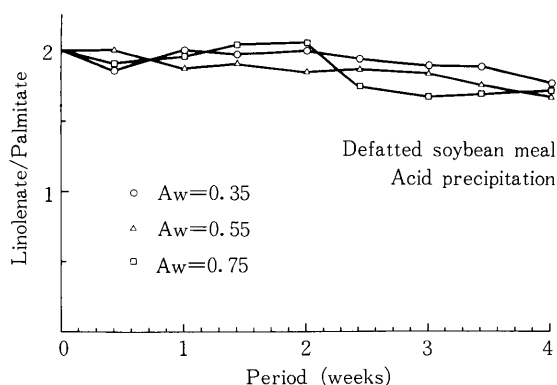


Fig. 6. Antioxidative stability of linolenate embedded in soy protein coagulation from DSM extract by acid precipitation. The specimens were the same as in Fig. 5.

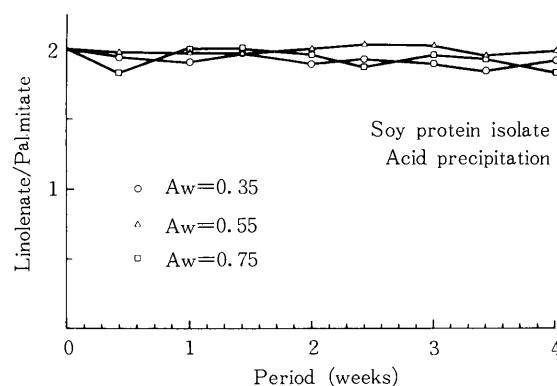


Fig. 7. Antioxidative stability of linolenate embedded in soy protein coagulation from SPI extract by acid precipitation. The experimental conditions were the same as in Fig. 6, except that SPI was used as protein source instead of DSM.

質の15%に対して更に2倍ほど高くなったが、Fig. 8に示す如く酸化安定性は単純混合より若干改善されたものの、大豆たん白質の効果に及ばなかった。

食品たん白質の種類が違えばたん白質・脂肪酸成分間の相互作用は異なるようであり、従って抗酸化効果の現れ方も一様でない。また凍結乾燥はたん白質粒子表面に無数の空洞をつくり通気性を増大させるおそれがある。今後、乾燥方法について改善を加えると同時に、起源の異なるたん白質成分の配合を試み、抗酸化効果の持続と不飽和脂肪酸捕捉率の向上をはかりたいと考えている。

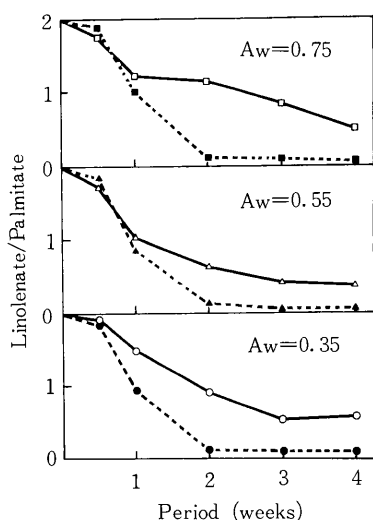


Fig. 8. Antioxidative stability of linolenate embedded in casein coagulation by acid precipitation. The experimental conditions were the same as in Figs. 6 and 7, except that casein was used as protein source instead of SPI or DSM; ● ▲ ■ simply mixed with casein particles, ○ △ □ acid-precipitated and quickly washed with hexane.

## 文 献

- 1) 田寺 泰, 平井愛山, 寺野 隆, 斎藤博幸 (1989): 心血管系疾患と不飽和脂肪酸. 食の科学, **138**, 33-39.
- 2) Yamamoto, N., Saitoh, M., Moriuchi, M. Nomura, M. and Okuyama, H. (1987): Effect of dietary  $\alpha$ -linolenate/linoleate balance on brain lipid compositions and learning ability of rats. *J. Lipid Res.*, **28**, 144-151.
- 3) 奥山治美, 山田和代 (1987): 必須脂肪酸バランス ( $\alpha$ -リノレン酸/リノール酸) と健康. 日農化会誌, **61**, 705-707.
- 4) 宮沢陽夫 (1989): 不飽和脂肪酸の過酸化. 食の科学, **138**, 65-70.
- 5) Iwami, K., Hattori, M. and Ibuki, F. (1987): Prominent antioxidant effect of wheat gliadin on linoleate peroxidation in powder model systems at high water activity. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 628-631.
- 6) 伊吹文男, 中村真理, 岩見公和 (1987): 大豆たん白質を用いた多価不飽和脂肪酸マイクロカプセル化の試み. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 20-24.
- 7) Yamauchi, F., Kurosawa, Y., Kamata, Y. and Shibasaki, K. (1980): Composition of acid-sensitive fraction in soybean proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2455-2459.
- 8) Hoyes, R. E., Bookwalter, G. N. and Bagley, E. B. (1977): Antioxidant activity of soybean flour and derivatives—a review. *J. Food Sci.*, **42**, 1527-1531.
- 9) Hammerschmidt, P. A. and Pratt, D. E. (1978): Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, **43**, 556-559.
- 10) Pratt, D. E. and Birac, P. M. (1979): Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, **44**, 1720-1722.