

大豆たん白質を主素材とする不飽和脂質酸化安定剤の開発

UTILITY OF SOY PROTEIN ISOLATE AND ITS ADMIXTURE AS ANTIOXIDANTS IN PRESERVATION OF HIGHLY UNSATURATED LIPIDS

伊吹文男・岩見公和（京都府立大学農学部）

Fumio IBUKI and Kimikazu IWAMI

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

ABSTRACT

Food proteins such as SPI, wheat gliadin and milk casein were examined for their antioxidant effects in powder model systems (37°C, various Aw's) using a mixture of each protein and its one-ninth amount of safflower oil. The antioxidant effect was evaluated by POV measurement or more correctly by gas-chromatographically determined portions of the constituent linoleic and palmitic acids in safflower oil. SPI was inferior to gliadin in anti-oxidation at high humidity, and *vice versa* at low and moderate humidities. Previous de-fat treatment of SPI and gliadin with chloroform-methanol (2:1) did not or little affect their antioxidant effects at high humidity. When a 1:1 mixture of SPI and gliadin was used to compensate for SPI not so much effective at high humidity as at low humidity, the constituent linoleic acid in safflower oil was kept intact through the experimental period of 6 weeks. It thus seems likely that blending of these food proteins in appropriate portions is effective in improving their individual functional and physical properties more favorably. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 11, 17-22, 1990.

高度不飽和脂肪酸の生体における機能的役割が明らかになるにつれ、飽和酸/不飽和酸比あるいはn-3/n-6比および食用に供される油脂の脂肪酸組成や摂取栄養素に占める割合が近年多大の関心を集めている^{1,2)}。不飽和脂肪の過剰摂取は各組織における構成脂肪酸の組成を変え、生体内でも酸化促進の危険因子となるおそれがある^{3,4)}。たとえそうであっても生理機能における重要性を考慮すれば、食物からの適正な補給を欠かすことはできない。抗酸化物質のみならず酸化促進物質を含む複雑な食品系においては、調理加工中の操作によって組織再編が起こり著しく酸敗が進むことが（その逆も）ある。不飽和脂肪の酸化が進めば、自身の栄養価喪失だけでなく他の栄養素の破壊をもたらし、

官能的にも食品価値低下の原因となる。食品中の主要栄養素であるたん白質は両親媒性を有し、様々な物性変化に関与するので、使い方の如何によっては糖質以上に抗酸化機能を発揮させることができるかも知れない。我々はこれまで、食品たん白質の持つ潜在的な抗酸化機能の再利用の方策を模索してきたが⁵⁾、今回、大豆たん白質や小麦グリアジンの抗酸化機能の現れ方と利用法に若干の検討を加えたのでその結果を報告する。

実験方法

試料調製

小麦グリアジンは、市販の小麦グルテンから70%エタノールで抽出される画分を集め噴霧乾燥によって粉

末化した。大豆たん白質は不二製油研究所より1988年秋に供与をうけ当研究室に低温保存しておいたフジプロR (以下, SPI) を用いた。ミルクカゼイン, α -コーンスターチおよび紅花油は, 市販の標品を更に操作を加えずにそのまま用いた。

保存実験⁶⁾

紅花油の20%ヘキササン溶液をたん白質 (小麦グリアジン, SPI, ミルクカゼイン) またはトウモロコシでんぷんと混合し, ヘキサンを蒸散させたものを50 mg ずつ小瓶に分注し, 36, 46, 56% (w/w) 硫酸水溶液を含む ($A_w=0.35, 0.55, 0.75$ に相当) 密閉容器で37℃に保存した*。容器中の空気は1週間毎に入れ換え, その都度サンプリング, クロロホルム-メタノール (2:1) 混液抽出によりサンプル中の紅花油を回収した。

* たん白質 (またはでんぷん) と紅花油の重量比は9:1である。

抗酸化能測定^{7,8)}

過酸化価 (ロダン鉄法) およびTBA 値の測定は常法に従った。溶媒揮散後の残留紅花油中の脂肪酸は, ナトリウムメトオキシドで処理してメチルエステル化し, 水素炎ガスクロマトグラフィーによって分析した (分析条件は Fig. 3 の脚注に記載)。ピーク位置 (保持時間) およびピーク面積は島津 C-R1B クロマトパックから求め, 残存リノール酸量をパルミチン酸に対する面積比の相対値 (%) として表した。

その他の分析条件

ラジカル捕捉能は, 1, 1-ジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) を用いて0.1 M, pH 7.5のリン酸緩衝液中で60分間反応させ, その525 nm における退色度より求めた⁷⁾。

スルフヒドリル (SH) 基の含量は, 8 M尿素を含む微アルカリ緩衝液中 NaBH_4 でジスルフィド結合を還元させたたん白質溶液 (正しくは懸濁液) を5, 5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸で処理し, 濁り除去後のろ液の412 nm における吸収増加量より求めた⁸⁾。

油吸収性は, 試料たん白質100 mg を0.5 ml の紅花油中に90分間浸してから遠沈, 膨潤した試料の体積変化から求めた⁹⁾。

結果と考察

Fig. 1 は各種食品たん白質と混合した紅花油中リノール酸の酸化安定性を過酸化価変化によって調べた結果である。当該食用油は, トコフェロールやその他数多くの天然抗酸化剤を含むと思われる, 空気を遮断した状態で低温に置いておけば何カ月でも保存することができる。これをヘキササン溶液にして精製トウモロコ

シでんぷんとよく攪拌混合し溶媒を揮散させた後, 相対湿度60~70% (未調整) の条件で37℃にインキュベートすると, ほぼ3週間で2,000 meq/kg oil に達する過酸化価が検出された。また, 食品たん白質粉末と混合させたものでは, トウモロコシでんぷんに比べ, ピークの高さが異なるものの, 3週間で (ミルクカゼイン) あるいはその1週間遅れで (SPI) ピークの出現がみられた。これに対し, 小麦グリアジンと混合させたものには6週間の実験期間を通じてピークの出現はみられなかった。

同じサンプルについて TBA 値を測定した結果を

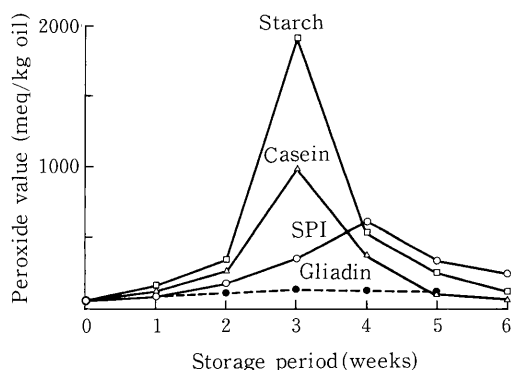


Fig. 1. Changes of peroxide values in a 9:1 mixture of food protein (SPI, gliadin or casein) and safflower oil during storage at 37℃ ($A_w=0.6\sim0.7$). Sample preparation, storage condition and analytical method were in detail described in Materials and Methods: \square , α -corn starch; \triangle , bovine milk casein; \circ , SPI; \bullet , wheat gliadin.

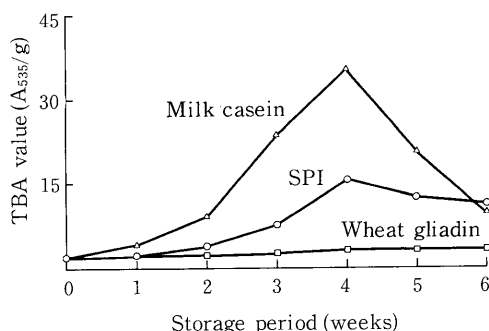


Fig. 2. Changes of TBA values in a 9:1 mixture of food protein (SPI, gliadin or casein) and safflower oil during storage at 37℃ ($A_w=0.6\sim0.7$). The same samples as in Fig. 1 were used for this assay. Symbols are same as in Fig. 1.

Fig. 2 に示した。TBA-陽性物質は過氧化物分解由来のものであり、POV と TBA 値間には若干のピークのずれが認められる。この場合でも小麦グリアジン含有サンプルの TBA 値はほとんど変化がなく、SPI はグリアジンには劣るがカゼインより抗酸化効果を持つとみなすことが出来る。しかし、このような POV や TBA 値のレベルが必ずしも不飽和脂肪酸残存量の程度を直接示しているわけではないので、次にサンプル油脂中の構成脂肪酸の分析を試みた。

Fig. 3 はメチルエステル化後、ガスクロマトグラフ分析によって得られたチャートの例で、左にこの実験で用いた紅花油の分析例を、右に保存実験開始2週目の SPI 含有サンプルの分析例を示した。自動酸化が進むとサンプル中の中性脂肪の回収率にも変化が生じ、リノール酸のみならずパルミチン酸のピーク面積も減少した。紅花油以外に内部標準として他の飽和脂肪酸を添加した場合、抽出効率に差が生じ紅花油中のリノール酸の変化を正しく求めることができなかったため、紅花油構成パルミチン酸とリノール酸の面積比から酸化の程度を求めることとした。

Fig. 4 は上述の方法で得られた各サンプルにおける

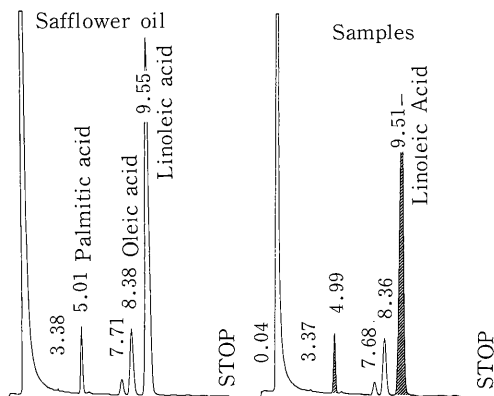


Fig. 3. Constituent fatty acids in safflower oil determined by gas chromatography. Oil extraction from samples and methylation of the constituent fatty acids were described in the text. Analytical conditions for gas chromatography are as follows: apparatus, Shimadzu GC-4BPF (hydrogen flame ionization); column, 3 mm ϕ ×3 m (glass capillary); packings, Unisol 3000/60~80 mesh Uniport (Gas-Chro Kogyo Inc.); carrier gas, nitrogen at a flow rate of 44 ml/min; column temp., 220 °C; inlet and outlet temp., 250 °C; hydrogen pressure, 0.5 kg/cm²; air pressure, 1.0 kg/cm².

リノール酸残存量の経時(週)変化を示したものである。POV, TBA 値にはほとんど変化のみられなかったグリアジン含有サンプルではリノール酸の減少も少なく、カゼイン含有および SPI 含有サンプルでは3~4週目で急激な変化がみられた。これによっても SPI はグリアジンに劣るがカゼインより優れた抗酸化効果を有するといえる。このような食品たん白質抗酸化効果の現れ方の違いはやや相対湿度の高い状態($A_w=0.6\sim0.7$)で得られたものである。サンプルの置かれた環境の水分活性が抗酸化効果発現に深く関与することはよく知られている¹⁰⁾。Fig. 5 は各水分活性($A_w=0.35, 0.55, 0.75$)における SPI, ミルクカゼイン, 小麦グリアジンの紅花油に対する抗酸化効果を比較したものである。SPI は高水分活性下におけるより低、中水分活性下においてむしろ高い抗酸化効果を示し、カゼインの効果は水分活性に関係なく、グリアジンは低、中水分活性下より高水分活性下で高い抗酸化効果を示した。SPI とグリアジンが水分活性の違いによって逆の傾向を示したことは興味深い。ここで用いた食品たん白質は必ずしも純粋に精製したものでないため様々な夾雑物を含んでいる。たん白質そのものの性質によるにせよ夾雑物の関与による¹¹⁾にせよ標品としての“大豆たん白質”と“小麦グリアジン”が高い潜在的抗酸化効果をもつことには変わりはない。そこでこれら標品の機能性を特徴づけるため、ラジカル捕捉性、

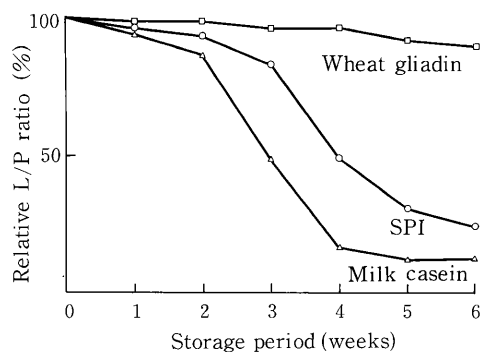


Fig. 4. Changes of the constituent linoleic acid in safflower oil in powder model systems mixed with SPI, gliadin or casein. The storage conditions were the same as in Figs. 1 and 2. The amounts of linoleic and palmitic acids remaining in safflower oil extracted from samples were determined by means of gas chromatography and expressed in % as their relative area ratio to the initial safflower oil.

SH 基含有量および油吸収性の観点から、他の代表的たん白質“標品”の性質と比較してみた。

Table 1 はその測定結果をまとめたものである。ラジカル捕捉性は SPI でやや高かったが、オボアルブミンやトウモロコシツェインに劣り、グリアジンやカゼインではかなり低かった。SH 基はカゼインにはほとんど含まれず、グリアジンと SPI のレベルはほぼ等し

かったが、アルブミンに遠く及ばなかった（アルブミンの抗酸化性は高くない）。油吸収性は SPI, グリアジン, カゼインで同じようなレベルにあったが、ツェイン, セラチン, 血清アルブミンの半分程度またはそれ以下であった。何れのパラメーターも低水分活性下における SPI の高い抗酸化性を説明しうるものでなかった。

SPI に含まれる脂質成分の詳細な解析は本間ら¹²⁾によって行なわれているが、SPI 及びグリアジンを再々クロロホルム-メタノール（2：1）で抽出洗浄し、できるだけ脂肪分を取り除いた標品を用いて高水分活性下における抗酸化効果を測っても未処理標品の効果と

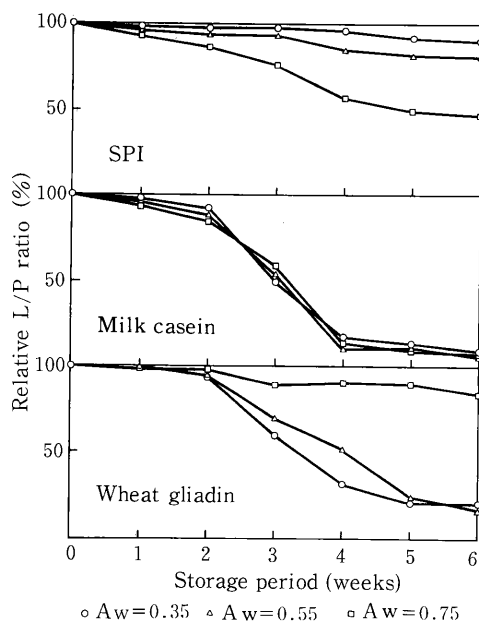


Fig. 5. Difference in antioxidant effects of SPI and gliadin in powder model systems stored at different A_w 's. A 9:1 mixture of SPI, gliadin or casein and safflower oil was stored at 37°C under the conditions different in A_w 's. The relative L/P ratio was estimated in the same manner as described in Fig. 4.

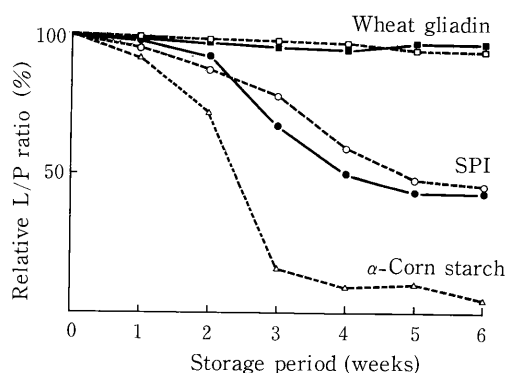


Fig. 6. No change in antioxidant effects of previously defatted SPI and gliadin at high A_w . SPI and gliadin which had been fully extracted with chloroform-methanol (2:1) were used to examine for their antioxidant effects. Broken and solid lines represent the samples without and with the previous extraction treatment, respectively: ○●, SPI; □■, wheat gliadin; △, starch.

Table 1. Oil absorbability, sulfhydryl content and radical-trapping ability of various proteins

	Oil absorbability	Radical-trapping	Sulfhydryl content
	ml/g protein	decolorization %	absorbance, 412 nm
Wheat gliadin	1.3	14.3	0.12
Wheat glutenin	2.4	14.2	0.15
Maize zein	2.6	51.8	0.05
Soy protein isolate	0.8	39.4	0.13
Bovine milk casein	1.0	17.1	0.02
Hen's ovalbumin	0.9	53.7	0.45
Porcine gelatin	2.5	2.9	0.01
Bovine serum albumin	2.3	35.4	0.37

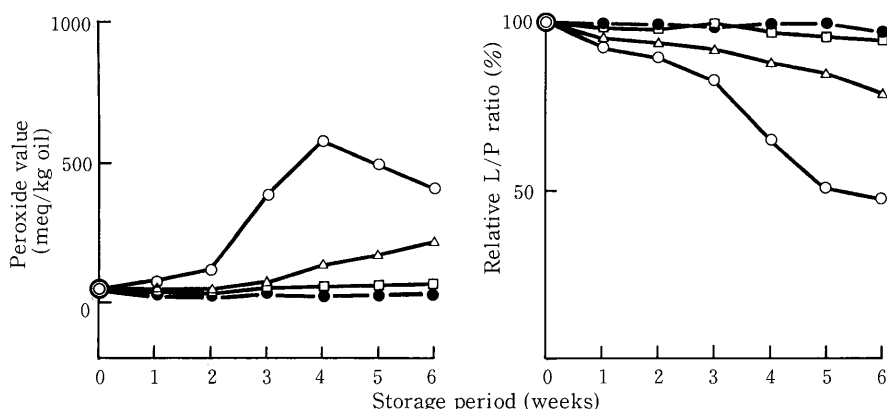


Fig. 7. Improvement in antioxidant effect of SPI at high A_w by mixing or coating with gliadin. A 9:1 mixture of protein and safflower oil was likewise incubated at 37°C and $A_w=0.75$. The procedures for POV and relative L/P ratio determinations were the same as above described: □, SPI-gliadin (1:1) mixture; △, gliadin-coated SPI; ○, SPI alone; ●, gliadin alone.

変わらなかった (Fig. 6)。このことは $A_w=0.75$ で認められた抗酸化効果が夾雑物の影響によるというよりもたん白質そのものの性質に由来したものであることを示唆している。

高水分活性下において効果を減ずる SPI を高水分あるいは中間水分活性食品に応用するためにはどうすればよいか? Fig. 7 は SPI とグリアジン混合物および SPI をグリアジン被膜で覆った標品 (何れもたん白質重量の10%相当の紅花油を含む) の $A_w=0.75$ における酸化安定化に及ぼす影響を示したものである。SPI/グリアジン比が小さくなるにつれ SPI 単独での効果より改善されグリアジンの効果に近くなった。しかし SPI をグリアジンで覆っても (グリアジン含有70%エタノール溶液に浸漬後、乾燥) 被膜形成の程度が不十分なためか、期待したほど抗酸化性は改善されなかった。今後他の食品たん白質との混合比を変え、機能性および物性改善の立場から実的な応用をめざして検討を進めたいと考えている。

文 献

- Holman, R. T. (1987): Essential fatty acids and nutritional disorders, in *Lipids in Modern Nutrition*, ed. by Horsberger, M. and Bracco, U., Vevey/Raven Press, New York, pp. 157-171.
- Sanders, T. A. B. (1988): Essential and trans-fatty acids in nutrition. *Nutr. Res. Rev.*, **1**, 57-78.
- Khaltav, N. G. (1987): Diet, risk factors, and cardiovascular diseases, in *Lipids in Modern Nutrition*, ed. by Horsberger, M. and Bracco, U., Vevey/Raven Press, New York, pp. 173-203.
- Dutie, G. G., Wahle, K. W. and James, W. P. (1989): Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.*, **2**, 51-62.
- Iwami, K., Hattori, M., Nakatani, S. and Ibuki, F. (1987): Spray-dried gliadin powders inclusive of linoleic acid (microcapsules): their preservability, digestibility and application to bread making. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3301-3307.
- Taguchi, K., Iwami, K., Kawabata, M. and Ibuki, F. (1988): Antioxidant effects of wheat gliadin and hens egg white in powder model systems: protection against oxidation deterioration of safflower oil and sardine oil. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 539-545.
- 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.
- Taylor, M. J. and Richardson, T. (1980): Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by

- hemoglobin. *J. Food Sci.*, **45**, 1223-1227.
- 9) Lin, M. J. Y., Humbert, E. S. and Sosulski, F. W. (1974) : Certain sunflower meal products. *J. Food Sci.*, **39**, 368-370.
- 10) Lubuza, T. P., McNally, L., Gallagher, D., Hawkes, J. and Hurtado, F. (1972) : Stability intermediate moisture foods: lipid oxidation. *J. Food. Sci.*, **37**, 154-159.
- 11) Hoyes, R. E., Bookwalter, G. N. and Bagley, E. B. (1977) : Antioxidant activity of soybean flour and derivatives—a new review. *J. Food Sci.*, **42**, 1527-1531.
- 12) 本間清一 (1990) : 分離大豆たん白質の糖脂質成分. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 7-10.