エマルション中における大豆たん白質の抗酸化活性に関する研究

宮下和夫*

北海道大学水産学部

Study on the Antioxidant Activity of Soybean Proteins in Emulsion Systems

Kazuo MIYASHITA

Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041-8611

ABSTRACT

This study was aimed at evaluating the antioxidant activity of various proteins on the triacylglycerol (TG) oxidation in emulsion. Of all proteins examined, soybean protein hydrolysates showed the most remarkable inhibitory effect and this activity increased with increasing degree of hydrolysis. However, the activity of other proteins was dependent on TG species. The antioxidant activity of water soluble proteins may be explained by their scavenging effect of free radicals and their adsorption ability on the emulsified TGs. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 58-62, 1998.

Key words : antioxidant activity, triacylglycerol, soybean protein hydrolysates, radical scavenger, adsorption effect

我々のこれまでの研究により[1-4]，高度不飽和脂肪酸（PUFA）及びそのエステルを水溶液中に分散させると，それらを空気中に放置した場合（バルク系）とはまったく逆に，不飽和度の高いもの程酸化されにくくなること，したがって，水系ではドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸（EPA）は，空気中とは異なり酸化に対して極めて安定となることが初めて明らかにされた．

こうした現象はPUFAを含むトリアシルグリセロール（TG）でも見られ，Fig. 1に示すように，DHAを多く含むマグロ眼窩油TGを合成乳化剤のTriton X-100を用いて水中に分散させると，その酸化をほぼ完全に抑制できることがわかった．しかし，これには多量の乳化剤が必要であり，また，高い酸化安定性を維持するためには，DHA含有TGの濃度もあまり上げられないことも明らかとなった．さらに，ここで使用された乳化剤は合成品であるので，これを多量に添加することは食品の風味，栄養価，イメージを損なう危険性もあると思われた．そこで本研究では，それ自体栄養効果のあるたん白質を用いて，TGをエマルションとして水溶液中に分散させることにより，高度不飽和TG，特にDHA含有TGの酸化安定性の向上を試みた．

*〒041-8611　函館市港町3-1-1

方　　法

試料油脂

大豆油TGと，マグロ眼窩油由来のDHA含量が異なる2種類のTGを，活性炭-セライトカラムクロマト

グラフィーで処理し，トコフェロールを除去した後，さらにケイ酸カラムクロマトグラフィーにて精製した．蛍光HPLC分析より，得られた精製TGにはトコフェロールが含まれていないこと，比色定量法[5]により，過酸化物価（PV）は1 meq/kg以下であることを確認した．

エマルション溶液の調製

合成乳化剤であるTritonを用いる場合は，クロロホルム中で一定量のTGとTriton X-100をよく混合した後，溶媒を完全に除去し，これにリン酸緩衝溶液を徐々に加えて均一な基質溶液を調製した．また，たん白質を乳化剤として用いる場合には，各たん白質のリン酸緩衝溶液を直接TGに加え，ホモジナイザーを使用して均一に分散させた．

エマルション中でのTGの酸化

各基質溶液10 mLを37℃，暗所でインキュベートした．反応溶液中の各成分の濃度は，TGが2.5 mg/10 mL, 5 mg/10 mL，50 mg/10 mLの3種類，また，Tritonは0.5%または0.2%，たん白質は0.2%とした．さらに反応開始剤としてAAPHも用いたが，その濃度は1 mMまたは5 mMとした．

酸化安定性の分析

エマルション中での各TGの酸化安定性は，酸化に伴う過酸化物の生成とPUFAの減少により比較検討した．この場合，過酸化物の測定にはロダン鉄法を用いた[6]．また，PUFAの減少は，酸化によるTG中の脂肪酸組成の変化より算出した．なお，酸化実験はすべて3回行い，得られた値は平均値±標準偏差として表わした．

ラジカル捕捉能の測定

DPPHを含む反応溶液に，一定量のたん白質溶液を添加し，DPPHラジカルに由来する517 nmでの吸光度の減少を測定することで，各たん白質のラジカル捕捉能を求めた．

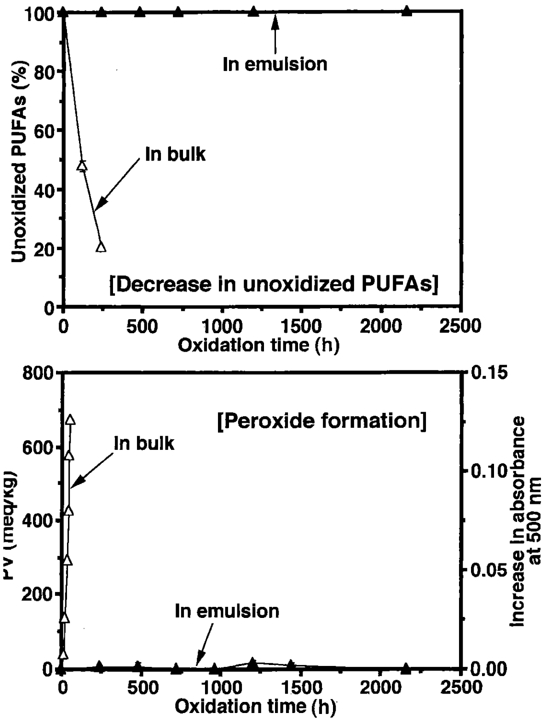

Fig. 1. Oxidative stability of DHA-TG (DHA: 16 mol%) in bulk and in emulsion. Bulk oil sample (2 g in 30 mL vial) and emulsion sample (TG: 0.25 mg/mL; Triton X-100: 0.5% (w/v)) were oxidized in the dark at 37℃. Oxidative stability was evaluated by measuring increase in peroxides and decrease in unoxidized PUFAs in TGs. Peroxide formation was determined by the colorimetric iodine method (PV) for bulk oil and by thiocyanate method (absorbance at 500 nm) for emulsion sample. Changes in the amount of unoxidized PUFAs were determined by GC. All data are expressed as mean ± SD values derived from the results of three independent experiments.

結果と考察

DHAを主要PUFAとするTGを水溶液中に分散させると，空気中にそれらを放置した場合とは異なり，ほとんど酸化されないことがわかった（Fig. 1）．この結果は，DHAやEPAといった酸化されやすいPUFAを含むTGをエマルション中に分散させることで，それらの酸化を効果的に防止できることを示唆するものであった．そこで，本研究では，それ自体高い栄養効果を有し，かつ抗酸化活性も期待できる水溶性のたん白質を用いてTGを水中に分散させ，その酸化安定性の向上を試みた．ただし，水溶液中ではDHA含有TGは酸化されにくいので，迅速かつ明確な結果を得るために，たん白質を用いた実験では，酸化開始剤（AAPH）を使用し，かつ，TG濃度をFig. 1の条件より高く設定して検討を行った．

その結果，2種類のDHA含有TG（Table 1）を，各種たん白質を用いて水溶液中に分散させた場合，大豆たん白質であるフジプロ-Dを用いた時にTGの酸化安定性が最も高くなることがわかった（Fig. 2）．しかし，

Table 1. Fatty acid profiles of DHA-TGs

Fatty acids	DHA-TG (DHA:16%)	DHA-TG (DHA:40%)
	(mol %)	
14:0	4.1	3.2
16:0	21.5	13.3
18:0	2.9	2.8
20:0	0.2	0.3
16:1n-7	9.5	4.5
18:1n-7	2.5	1.5
18:1n-9	25.5	11.1
20:1n-9	1.5	2.2
16:2n-4	0.9	1.0
18:2n-6	1.0	0.7
16:3n-4	1.2	0.8
18:3n-3	0.4	0.2
20:4n-6	1.9	3.5
20:5n-3	4.6	5.3
22:5n-3	1.2	2.5
22:5n-6	0.8	2.4
22:6n-3	16.3	40.4
Bisallylic positions (per one molecule)	3.66	7.86
Degree of unsaturation (per one molecule)	5.76	10.24

同じ大豆たん白質であっても，プロリーナではフジプロ-Dほどの安定化効果は見られなかった．一方，カゼインとプロタミンの安定化効果は大豆たん白質に比べてかなり低かった．また，アルブミンはDHA 16%のTGに対してのみ強い安定化効果を示した．このように，たん白質のDHA含有TGに対する効果は，DHAの濃度によっても特徴の見られることが明らかとなった．さらに，大豆たん白質は，用いた2種類のDHA含有TGのいずれに対しても，合成乳化剤より高い安定化効果を示した．特に，酵素処理により部分分解を行ったフジプロ-Dは非常に高い安定化作用を有し，酸化開始剤を用いなければ，かなり長時間DHA含有TGの酸化を完全に抑制できるものと推測された．また，大豆油TGを用いた実験においても，酵素分解大豆たん白質は他の水溶性たん白質に比べてより高い安定化効果を示した．

Fig. 2の結果より，大豆たん白質がエマルション中での油脂の酸化をより効果的に抑制し，この効果は大豆たん白質を酵素分解することにより一層高まることがわかった．そこで，分解度の異なる5種類の大豆たん白質（ニューフジプロ-KM，フジプロ-AL，フジプロ-CL，ハイニュート-DL，ハイニュート-S）のTG酸化に対する影響を調べた（Fig. 3）．ただしこの場合，TG

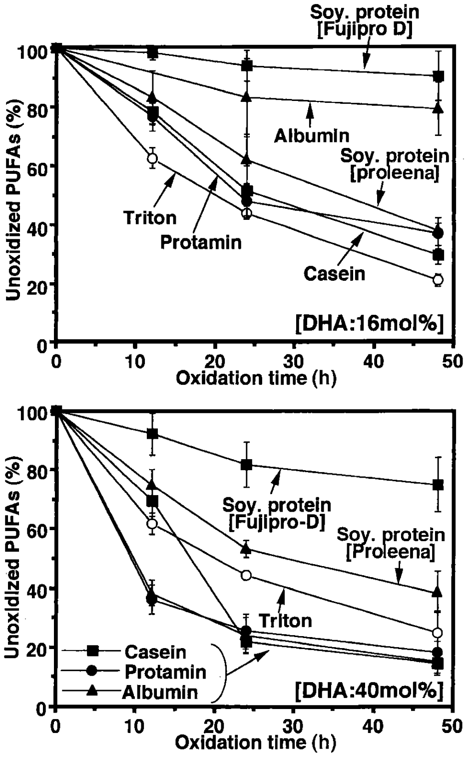

Fig. 2. Oxidative stability of DHA-TGs dispersed with various proteins in emulsion. TG (0.5 mg/mL) was oxidized in the dark at 37℃ with AAPH (1 mM) as a radical initiator in a phosphate buffer (pH 7.4 at 37℃) containing 0.2% (w/v) of Triton X-100. The unoxidized substrate was determined by GC. Data represent mean ± SD values from three separate experiments.

の酸化安定性はかなり向上すると思われたので，AAPHの濃度はFig. 2の実験条件の5倍とし，TG濃度も5倍に設定して検討を行った．その結果，図から明らかなように，いずれのTGにおいても分解度が高くなるにつれて，酸化安定性も向上することがわかった．しかし，DHA 16%では分解度の上昇に伴う酸化抑制効果の度合がそれほど顕著でなかったのに対し，DHA 40%では5種類のたん白質分解物間でかなりの違いが見られ，ハイニュートSでは多量のAAPHを添加しているにもかかわらず，TGの酸化がほぼ抑制されることがわかった．

たん白質の抗酸化効果に関しては，これまでも多数の報告があり，一般的にその効果は，たん白質が有するラジカル捕捉作用[7,8]などに起因するとされている．

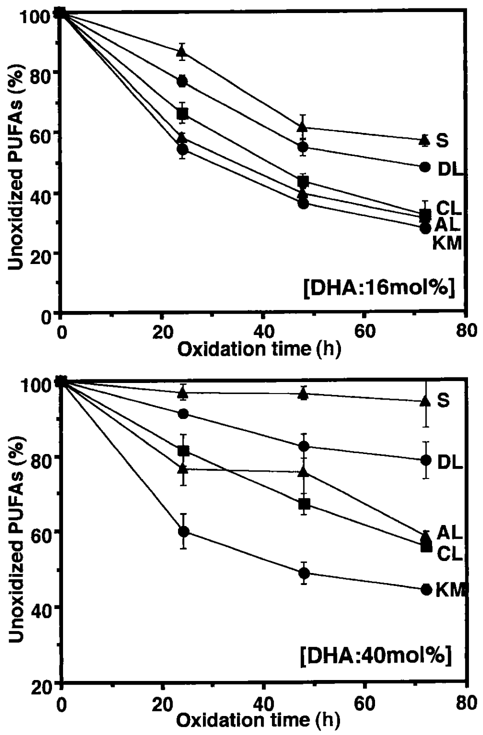

Fig. 3. Oxidative stability of DHA-TGs dispersed with soybean protein hydrolysates in emulsion. TG (5 mg/mL) was oxidized in the dark at 37℃ with AAPH (5 mM) as a radical initiator in a phosphate buffer (pH 7.4 at 37℃) containing 0.2% (w/v) of Triton X-100. The unoxidized substrate was determined by GC. Data represent mean ± SD values from three separate experiments.

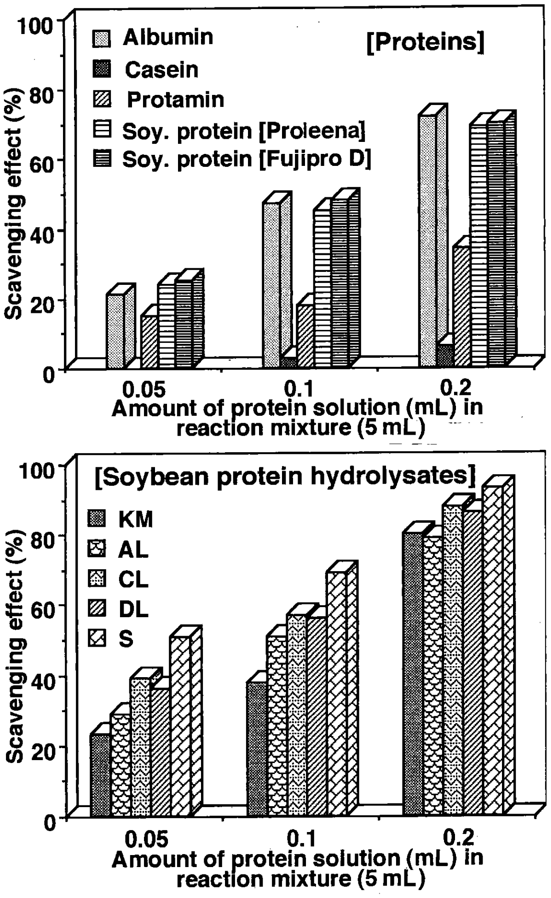

Fig. 4. Scavenging effect of various proteins and soybean protein hydrolysates on DPPH radical. Reaction mixtures contained 1.0 mL of ethanolic solution of DPPH (0.5 mM), 2.0 mL of ethanol, and 2.0 mL of 0.1 M sodium acetate buffer containing a definite amount of protein solution. The mixture was incubated at 37℃ for 30 min, and then the absorbance of the resulting solution was measured spectrophotometrically at 517 nm.

そこで本研究で用いたたん白質のラジカル捕捉能について，DPPHラジカルに対する作用を指標として検討したところ，Fig. 4に示したように，各種たん白質はいずれもラジカル捕捉能を有したが，その効果には違いが見られ，大豆たん白質やアルブミンが比較的高い活性を示した．また，大豆たん白質を分解することによってもその活性は増大した．しかし，たん白質の酸化抑制効果はTGの種類によって異なることから，TGの酸化安定性に対する各たん白質の酸化抑制効果を，そのラジカル捕捉能だけで説明することはできないと思われた．そこで，各たん白質のTGに対する吸着能力についても検討したところ，酸化抑制能力の高いたん白質は，TGに対する吸着能力も強いことが示された．したがって，エマルション系でのTGの酸化に対するたん白質の酸化抑制効果は，そのラジカル捕捉能の他に，TGに対する吸着能力によっても大きく影響を受けることが推測できた．すなわち，たん白質とTGとが適当な複合体を形成することで，たん白質の有する化学的な抗酸化活性がより発揮しやすくなり，かつ，たん白質によってTG中のPUFAの酸化を物理的に保護することができるものと考えられた．

要 約

各種たん白質並びに酵素分解大豆たん白質のTGエマルションに対する酸化抑制効果について検討した．各たん白質によってTGに対する酸化抑制効果は異なり，大豆たん白質がTGに対して最も高い安定化効果を示した．また，大豆たん白質の酸化抑制効果は，酵素分解することで強くなり，その効果は分解度に比例して増大した．たん白質のTGエマルションに対する酸化抑制効果は，たん白質が有するラジカル捕捉能の他，TGに対するたん白質の吸着能にも起因していると考えられた．

文 献

1) Miyashita K, Nara E and Ota T(1993): Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids in an aqueous solution. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1638-1640.
2) Hirano S, Miyashita K, Ota T, Nishikawa M, Maruyama K and Nakayama S(1997): Aqueous oxidation of ethyl linoleate, ethyl linolenate, and ethyl docosahexaenoate. *Biosci Biotech Biochem*, **61**, 281-285.
3) 宮下和夫 (1996)：水分散系における高度不飽和脂肪酸の酸化安定性．日本食品科学工学会誌，**43**, 1079-1085.
4) 宮下和夫 (1998)：水溶液中での脂質過酸化．「脂質栄養と脂質過酸化物-生体内脂質過酸化は傷害か防御か-」，日本脂質栄養学会編，学会センター関西，大阪，pp. 85-94.
5) Takagi T, Mitsuno Y and Masumura M (1978): Determination of peroxide value by the colorimetric iodine method with protection of iodine as cadmium complex. *Lipids*, **13**, 147-151.
6) 満田久輝，安本教傳，岩見公和 (1966)：リノール酸の自動酸化に対するインドール化合物の抗酸化作用．栄養と食糧，**19**, 210-214.
7) Rhee KS, Ziprin YA and Rhee KC (1979) : Water-soluble antioxidant activity of oilseed protein derivatives in model lipid peroxidation systems of meat. *J Food Sci*, **44**, 1132-1135.
8) Taylor MJ and Richardson T (1980): Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin. *J Food Sci*, **45**, 1223-1227, 1230.