

ガラクトマンナンとの複合体形成による大豆たん白質 由来の抗酸化剤の開発

中村宗一郎*

島根大学教育学部

Development of Novel Antioxidants Originated from Soy Protein by Conjugation with Galactomannan

Soichiro NAKAMURA

Faculty of Education, Shimane University, Matsue 690-8504

ABSTRACT

Phytic acid associated proteins (pAPP) and polypeptides (SPP) were prepared from acid precipitated proteins from SPI (APP) and tryptic digests of SPI, respectively, by using ion-exchange chromatography with DEAE-Sephacel Fast Flow. A polysaccharide, galactomannan was prepared from soybean's brawn. APP, pAAP and SPP were conjugated with galactomannan *via* a naturally occurring Maillard reaction at 60°C in 79% relative humidity for 2 weeks. Chelating activities of pAAP and SPP were not significantly lowered by the polyglycosyl modification. On the other hand, emulsifying properties of pAPP and SPP were dramatically improved by the controlled Maillard-type conjugation. Besides, radical scavenging power was substantially elevated by the conjugation, thus resulting in high antioxidant effects in pAPP- and SPP-galactomannan conjugates. This study suggests that the phytic acid associated proteins and polypeptides could be used as a new food antioxidant having good emulsifying properties. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 34-39, 2000.

Key words : phytic acid, galactomannan, Maillard-type conjugation, emulsifying properties, radical scavenging power, antioxidant activity

現在、食品業界で使用されている抗酸化剤の多くは化学的に合成されたものが多く、しばしばその取り扱いが問題にされてきた。我々はこれまでに、天然中に存在する食品成分としてオボアルブミンやホスビチンに抗酸化性があることを明らかにし、これらの食品たん白質が天然のメイラード反応の初期に起こるシッフ

の塩基形成反応によって多糖修飾されると、それらの抗酸化効果は著しく上昇することを報告している^{1,2)}。そこで本研究では、フィチン酸の金属イオンキレート効果に着目し、分離大豆たん白質からフィチン酸結合たん白質およびフィチン酸結合ペプチドを分離し、それらを上述した化学試薬を用いない方法で多糖修飾し、大豆たん白質に由来する抗酸性食品素材を開発することを試みた。本研究では、多糖類に大豆種皮由来のガ

* 〒 690-8504 松江市西川津町 1060 番地

ラクトマンナンを用いており、大豆由来の食品成分間で複合体を形成させ、まったく新しいタイプの食品素材として資源の高度利用を図ろうとしている点に特長がある。

方 法

フィチン酸結合大豆たん白質およびペプチドの単離

フィチン酸結合大豆たん白質は、まず分離大豆たん白質（不二製油製）を 0.01 M 2-メルカプトエタノール含有 0.03 M トリス-HCl 緩衝液に懸濁し、1 時間攪拌後、濾液を pH 4.8 に調整し沈澱物を分別した。得られた沈澱物を一旦溶解後、50 mM のリン酸緩衝液（pH 7.4）で平衡化した DEAE-Sepharose Fast Flow にかけて、0.5 M の NaCl 含有緩衝液で溶出した。この溶出画分をフィチン酸結合大豆たん白質として、以下の実験に用いた。一方、フィチン酸結合大豆ペプチドの調製は、Sato らの方法³⁾ に準じて行った。すなわち、分離大豆たん白質 4.0 g を 0.1 M リン酸緩衝液（pH 8.0）196 mL に懸濁し、これに 40 mg/mL のトリプシンを加え、37℃ で 3 時間インキュベーションして消化後、最終濃度 10% のトリクロロ酢酸によって除たん白し、透析（MW cut-off 1,000）後、陰イオン交換クロマト（DEAE-Sepharose Fast Flow）によってフィチン酸結合大豆ペプチドを調製した。

分離されたフィチン酸結合大豆たん白質およびフィチン酸結合大豆ペプチド中のフィチン酸量は、Latta and Eskin の文献⁴⁾ に基づいて改良 Wade 試薬を用いて行った。

大豆種皮からガラクトマンナンの単離

大豆種皮からのガラクトマンナンの精製は、Aspinall and Whyte の方法⁵⁾ に基づいて行った。すなわち、まず大豆を 24 時間、アセトン中に浸漬し、種皮を分離した。次に、石油エーテルで脱脂し、さらにエタノール（4:1）洗浄後、着色物質および可溶性物質を除去した。この脱脂種皮に 10 倍量の純水を加えてホモゲナイズし、水で 3 回連続抽出した。濾液を濃縮し、pH 調整によって除たん白後、エタノール沈澱によって粗多糖画分を得た。粗多糖画分 1 g を純水 1 L に溶解し、7% 酢酸銅 100 mL を加え、生じた沈澱を遠心分離によって除去し、上清に 2 倍量のエタノールを加え、銅複合体を沈澱させた。この沈澱物を最終的に 1% 塩酸含有エタノールで精製したものをガラクトマンナンとした。収率は、1.5% であった。

複合体の形成

フィチン酸結合大豆たん白質あるいはペプチドとガ

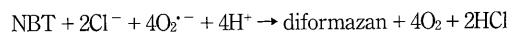
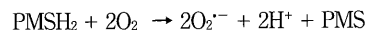
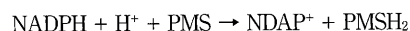
ラクトマンナンとの複合体の形成には、コントロール化した温度と湿度の環境下でメイラード反応を起こさせる方法^{1,2)} を利用した。すなわち、等量の供試たん白質（あるいはペプチド）とガラクトマンナンとを一旦溶解し、凍結乾燥後、その粉末を相対湿度 79% で、2 週間、60℃ に加熱して、供試たん白質（あるいはペプチド）の遊離アミノ基とガラクトマンナンの還元末端とを化学的に共有結合させた。複合体の形成は、SDS-PAGE⁶⁾ によって確認した。

抗酸化試験およびラジカル捕捉能の測定

複合体の抗酸化効果は、セライト（No. 545, 和光純薬）を基礎材として、これに試料とリノール酸メチルを加え、モデル食品を調製し、TBA と POV を指標にして脂肪酸の酸化の進行を追跡する方法^{1,2)} で行った。同時に、抗酸化能の高感度評価法であるプラスミド DNA を用いる方法^{7,8)} も試みた。すなわち、サンプル、30 mM EDTA、50 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）、30 mM H₂O₂ および 13 mM FeSO₄ の等量混合溶液に各液と等量のプラスミド DNA、pUC19 を混合し、1 時間インキュベーションした。この反応系では、次のようにヒドロキシラジカルが発生する。



所定の時間インキュベーション後、アガロースゲル電気泳動し、ccc（スーパーコイル状の DNA）、oc（オープン状の DNA）および lc（直線状の DNA）の出現比率を測定し、試料の抗酸化能を評価した。一方、試料のスーパーオキシドラジカル捕捉能についても調べた。この実験は、Ponti らの方法⁹⁾ に基づいて行った。すなわち、NADPH と NBT との混合溶液に PMS を加えたときに発生するスーパーオキシドの量を diformazan 発生量として求めた。反応式は、次のとおりである。



金属イオンキレート能の測定

フィチン酸結合大豆たん白質（あるいはペプチド）およびそれらの多糖類複合体の金属イオンキレート能は Khan らの方法¹⁰⁾ に従って、鉄を供試金属イオンとして行った。すなわち、100 mg/L の FeSO₄ 溶液に試料を溶解混合、10 分間攪拌後、限外濾過（MW cut-off 1,000）し、濾液中の遊離鉄イオンを原子吸光度計によって測定し、供試試料に結合した鉄イオン量を求め、金属イオンキレート能とした。

結果と考察

フィチン酸結合大豆たん白質およびペプチドの分離精製

分離大豆たん白質から酸沈澱たん白質(以下, APP と表す)を調製し, 次に Fig. 1 に示すように, 陰イオン交換クロマトによってフィチン酸結合大豆たん白質(以下, pAPP と表す)を調製した. 一方, 分離大豆たん白質をトリプシンで加水分解し, フィチン酸結合大豆ペプチド(以下, SPP と表す)を調製した (Fig. 1).

凍結乾燥した APP, pAPP および SPP 中のフィチン酸量は, それぞれ 0.2%, 3.2% および 7.7% であった.

大豆たん白質の乳化性の変化とガラクトマンナンとの複合体の形成

APP, pAPP および SPP の乳化性を調べた結果, Fig. 2 に示すように, 分離大豆たん白質からフィチン酸結合画分を pAPP あるいは SPP として分離すると, 乳化性は著しく低下することが明らかにされた. 食品由来の抗酸化剤を開発する上で, 油との親和性が低下することは大きなマイナス要因である. そこで, 大豆種皮から分離されたガラクトマンナンを用いて, フィチン

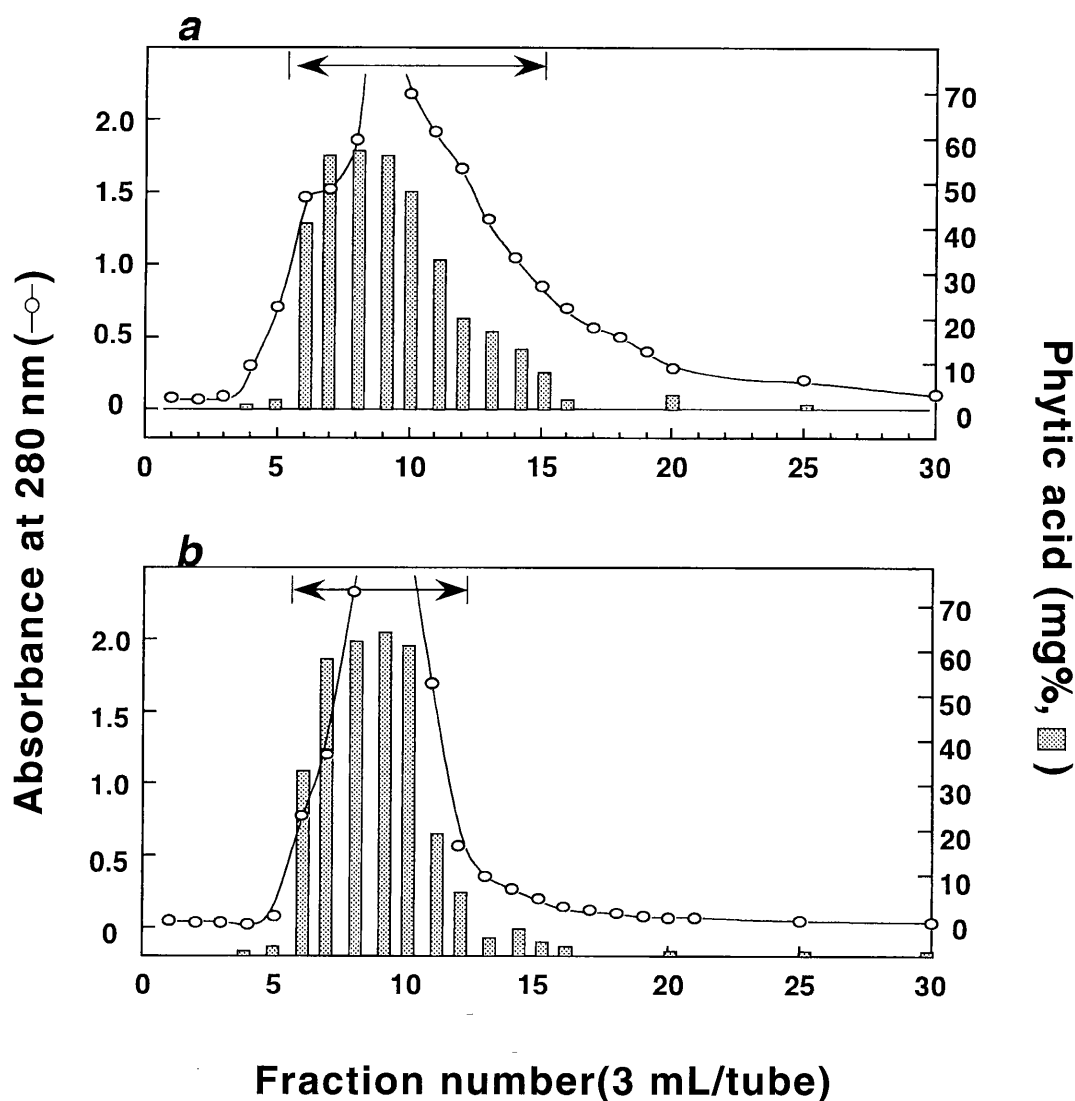


Fig. 1. Preparation of phytic acid associated proteins (a) and polypeptides (b). The fractions indicated by horizontal arrows were pooled, dialyzed, and used for further experiments.

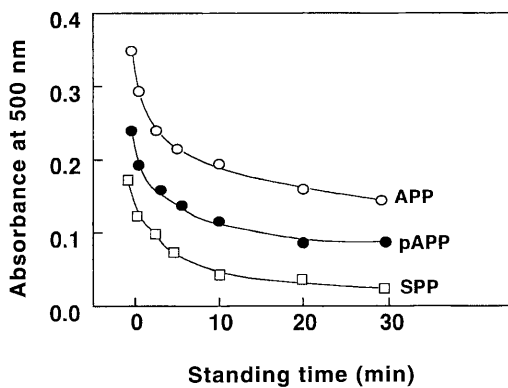


Fig. 2. Poor emulsifying properties of phytic acid associated proteins (pAPP) and polypeptides (SPP), compared with acid precipitated proteins from SPI (APP).

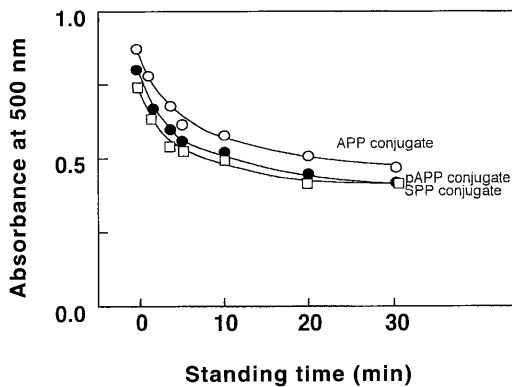


Fig. 3. Improved emulsifying properties of APP, pAPP and SPP by the conjugation with galactomannan.

酸結合大豆たん白質およびペプチドの多糖類修飾を試みた。APPもコントロールとして多糖類修飾を行った。APPとpAPPは2週間、SPPは3日間のインキュベーションによって複合体を形成することが示されたので、これらの乳化性を調べた。その結果、Fig. 3に示すように、pAPPおよびSPPのいずれについても、複合体形成によって、APPには及ばないものの、乳化性は著しく向上することが明らかにされた。

ガラクトマンナン複合体の抗酸化効果

APP, pAPPおよびSPPとガラクトマンナンとの複合体のリノール酸メチルの酸化に対する抗酸化効果を調べた結果をFig. 4に示す。いずれの場合にも、このメイラード反応の初期に発生するシッフの塩基形成反応

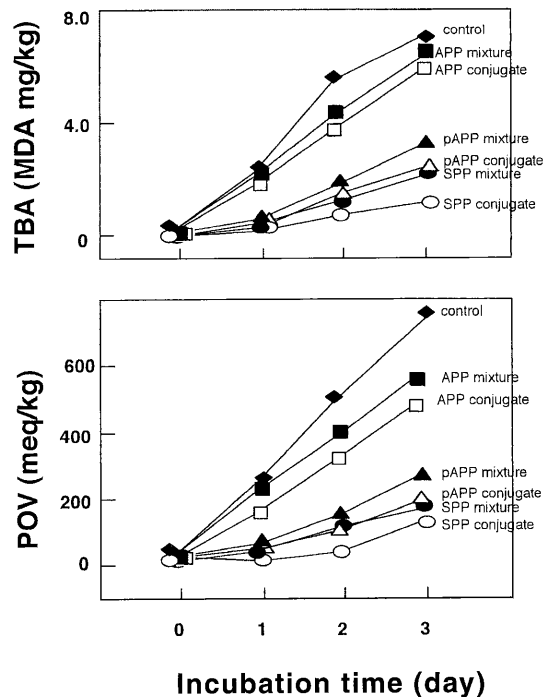


Fig. 4. Enhanced antioxidant effects of APP, pAPP and SPP by the conjugation with galactomannan.

(Fig. 5) を利用した多糖類修飾が大豆たん白質の抗酸化効果を改善する作用を示すことが示された。すなわち、pAPPあるいはSPPとして分離すると、未修飾のままでも大豆たん白質の抗酸化能を著しく上昇させることが明らかにされた。またその効果は、多糖類修飾によって強化されることが明らかにされた。このことは、Figs. 6および7に示すように、pAPPおよびSPPの金属イオンキレート能が多糖類修飾によって大きく減ずることなく (Fig. 6)、新たにスーパーオキシドラジカル捕捉能が発現した (Fig. 7) ことと密接に関係していると推測された。多糖類複合体のラジカル捕捉能については、プラスミドDNAを用いてヒドロキシラジカル捕捉能を調べる実験でも同様な結果が得られた。また多糖類複合体の抗酸化効果の著しい上昇については、前述した油との親和性の改善が大きく寄与していると推測される。

以上のようなことから、本研究では、分離大豆たん白質からフィチン酸結合画分を分離し、大豆種皮から分離した多糖類で修飾すると乳化性に富んだ抗酸化性の新規な食品素材が創製される可能性が強く示唆された。

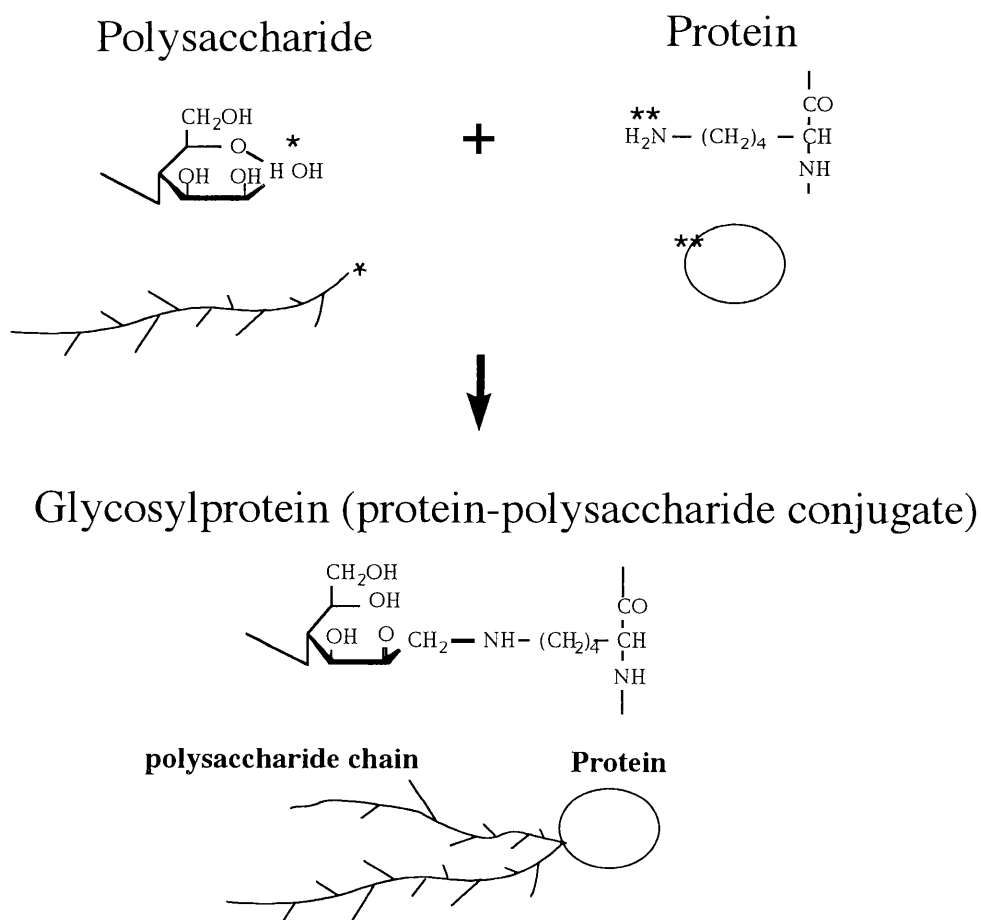


Fig. 5. Scheme of the production of protein-polysaccharide conjugate through naturally occurring Maillard reaction.

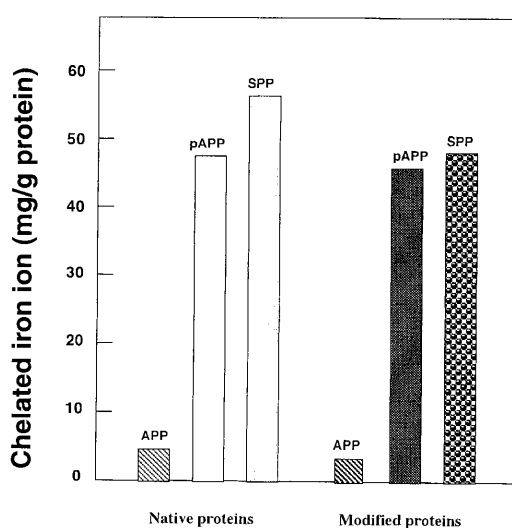


Fig. 6. Changes of ion binding capacities of APP, pAPP and SPP by the conjugation with galactomannan.

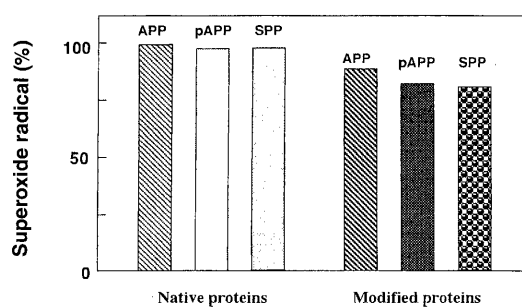


Fig. 7. Changes of super oxide radical scavenging effects of APP, pAPP and SPP by the conjugation with galactomannan.

要 約

分離大豆たん白質から酸沈澱たん白質、フィチン酸結合大豆たん白質およびフィチン酸結合大豆ペプチドが調製された。フィチン酸結合大豆たん白質およびペプチドの乳化性は、酸沈澱たん白質に比べ、著しく低い値を示した。しかし、大豆種皮から分離されたガラクトマンナンとメイラード反応を使用した方法で化学的に共有結合させると乳化性は飛躍的に改善された。フィチン酸結合大豆たん白質およびペプチドは、優れた抗酸化性を示した。これらを多糖類修飾すると、さらにその抗酸化効果は強化された。これは、フィチン酸結合大豆たん白質およびペプチドの金属イオンキレート能に加えて、新たに発生したラジカル捕捉能と乳化性によるものと推測された。

文 献

- 1) Nakamura S, Kato A and Kobayashi K (1993): Enhanced antioxidant effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharide. *J Agric Food Chem*, **40**, 2033-2037.
- 2) Nakamura S, Ogawa M, Nakai S, Kato A and Kitts DD (1998): Antioxidant activity of a Maillard-type phosvitin-galactomannan conjugate with emulsifying properties and heat stability. *J Agric Food Chem*, **46**, 3958-3963.
- 3) Sato R, Noguchi T and Naito H (1986): Casein phosphopeptide (CPP) enhanced calcium absorbance from the ligated segment of rat small intestine. *J Nutr Sci Vitaminol*, **32**, 67-73.
- 4) Latta M and Eskin M (1980): A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J Agric Food Chem*, **28**, 1313-1315.
- 5) Aspinall GO and Whyte JNC (1964): Polysaccharides of soy-beans. Part I. Galactomannans from the hulls. *J Chem Soc*, 1964 Mar, 5058-5063.
- 6) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 7) Repine J, Pfenninger OW, Talmage DW, Berger EM and Pettijohn DE (1981): Dimethyl sulfoxide prevents DNA nicking mediated by ionizing radiation or iron/hydrogen peroxide-generated hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 1001-1003.
- 8) Wijewickreme AN, Krejpcio Z and Kitts DD (1999): Hydroxyl scavenging activity of glucose, fructose, and ribose-lysine model Maillard products. *J Food Sci*, **64**, 457-461.
- 9) Ponti V, Dianzani K, Cheeseman K and Slater TF (1978): Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADPH and phenazine methosulphate. *Chem Biol Interact*, **23**, 281-291.
- 10) Khan MAS, Nakamura S, Ogawa M, Akita E, Azakami H and Kato A (2000): Bactericidal action of egg yolk phosvitin against *Escherichia coli* under thermal stress. *J Agric Food Chem*, **48**, 1503-1506.