

大豆油精製工程廃棄物に含まれる生理活性物質 体重増加抑制効果をもつ化合物の探索

戸谷永生*

神戸学院大学栄養学部栄養生理学研究室

Bioactive Substances Contained in Discharges Generated during Soybean Oil Refinement —A Search for Weight-Loss Promoting Compounds—

Nagao TOTANI*

Department of Nutritional Physiology, Faculty of Nutrition,
Kobe-Gakuin University, Kobe 651-2180

ABSTRACT

The number of over-weight Japanese, especially men between 20-60 years old, has been increasing. Proper diet and physical exercise have long been recommended to reduce obesity, but these are often not easy to maintain in daily life. We reported previously that soybean oil heated with soybean protein under reduced pressure followed by filtration (Soy Oil) showed weight-loss promoting effects in rats, and that ferulic and gallic acids contained in vegetable have a much more pronounced effect when esterified. In the present study, the weight-loss promoting substances were found to exist in the polar fraction of Soy Oil. In addition, the existence of these substances in crude soybean and clay-adsorbed oils was investigated by instrumental analyses as the method for Soy Oil preparation is partly similar to the process used in manufacturing commercial soybean oil. Results show that the crude soybean oil polar fraction contained acylglycerols, phenolic compounds and fatty acids similar to those in the Soy Oil polar fraction. The clay-adsorbed oil polar fraction consisted of acylglycerols as main components and phenolic compounds in addition to aldehydes; remarkable decreases in double bond signals and aldehydes are due to oxidation. Further study is expected because crude soybean oil should be a source of weight-loss promoting substances, although the chemical structures of the substances were not identified. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 38-45, 2012.

Key words : weight-loss promoting compound, soybean oil, polar fraction, crude oil

*〒651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬518

近年肥満者数は増加の一途をたどり、20～60歳代男性の肥満者が目立ってきた¹⁾。適切な食事摂取と適度な運動の必要性が叫ばれて久しいが、多忙な現代社会においてその実行は難しいことが多い。これまでに上市された主なダイエット油として、共役リノール酸、サトラリム、カブレニン、オレストラ、エコナ、リセッタ等が挙げられるが、味覚・油脂としての使い勝手・糞便との親和性・価格・安全性などの面から、それらが広く受け入れられる状態には至っていない。我々は食用油に大豆たん白質を加え、減圧下で加熱後ろ過して得た油脂 (Soy Oil) は、ラットにおいて体重増加抑制効果を示し²⁾、また植物性たん白質に含まれるフェルラ酸や没食子酸のエステル体もその効果が高いことをこれまでに報告した^{3,4)}。本研究では、薄層およびカラムクロマトグラフィーを用いて分画したSoy Oil中の極性画分が体重増加抑制物質であることを動物飼育実験により示したのち、Soy Oilを調製する方法が大豆から精製大豆油を生産する工程の一部に類似することから、大豆未精製油 (粗原油) と廃白土吸着油中の体重増加抑制物質の存在を機器分析により検討した。

方 法

市販新鮮大豆油を大豆たん白質と共に減圧下180℃で5時間加熱後、ろ過して外観・性状ともに原料油と大差のない油 (Soy Oil) を得た。TLC分析 (hexane/diethyl ether, 8:2 v/v) によりRf値 0, 0.03, 0.11, 0.16, 0.20, 0.91 (トリアシルグリセロール) にスポットを確認した。次いでSoy Oilをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに数回かけ、トリアシルグリセロールと極性画分1 (Rf値 0, 0.03, 0.11, 0.16, 0.20)、極性画分2 (Rf値 0.20) を分画した。得られたトリアシルグリセロールを標準飼料AIN93G (無脂肪) に7%添加し、2通りの極性画分は同飼料に7%の新鮮大豆油 (極性画分を上記と同様に除去後使用、コントロール群にも使用) と共に各々添加した。調製した4種飼料をウィスター系雄性ラットに自由摂取させた。12週間飼育後ネンブータル麻酔下で開腹し、血液・肝臓・腎臓・後腹膜脂肪組織を採取した。また、血清を調製して中性脂肪・総コレステロール・リン脂質・遊離脂肪酸・グルコース濃度を分析した。なお、本動物実験は神戸学院大学動物実験指針に準拠して実施した。

一方、大豆油製造工程において大豆を圧搾・抽出して得た粗原油と、脱色に用いられた廃白土をJ-オイルミルズより入手した。廃白土に吸着している油はクロロホルム/メタノール, 2:1 v/vを用いて抽出した。そ

れらの極性画分 (Rf値 0-0.16) を、上記のシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび厚さ2 mmの調製用TLCを用いて単離後、Soy Oil極性画分と共にIR (赤外分光光度計 FT/IR-4100, 赤外顕微鏡 IRT-5000, 日本分光株式会社), GC-MS (Agilent 6890 N [GC], 5.973 N [MS], Agilent Technologies, Inc., column: Rxi-35Sil MS or DB-5MS, Agilent Technologies, Inc., 60℃ (1分間保持) →10℃/分→300℃, イオン化電圧70 eV, イオン化法EI), ¹H NMR (Valian NMR System 500, Valian, Inc., 測定温度25℃, 積算回数2,048回), ¹³C NMR (Valian NMR System 500, Valian, Inc., 測定温度25℃, 積算回数10,000回) 分析する一方、既存の分析結果をライブラリー検索し、今回の分析結果と比較して成分の化学構造を推定した。

結果と考察

クロマトグラフ分画して得たSoy Oil極性画分1, 粗原油と吸着油の極性画分はともに黄色油状であり、Soy Oil極性画分2は白色綿状であった。コントロール群の餌に用いる市販新鮮大豆油はTLC上で同様の極性物質を含んでいたため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより極性画分を除去したのち混餌に用いた。動物飼育実験の結果、全ての群において外見的に異常は認められず、摘出した臓器も正常で重量の有意差もなかった。しかし、極性画分1を摂取した群の体重増加は、試験5週あたりから徐々に大豆油を摂取したコントロール群よりも減少し、12週目には有意差が認められた (Fig. 1)。極性画分2摂取群とSoy Oil極性画分抜き摂取群はコントロール群と同様の体重増加が見られた。極性画分1が摂取量に与える影響は認められず、食物効率 (Fig. 2) の結果も体重増加の結果と同様に極性画分1を摂取した群が低かった。臓器重量や血清分析値には特記する変化が認められなかった。これらの事より極性画分1には、安全で体重増加を抑制する物質の存在の可能性が示された。

極性画分1, 2および粗原油・廃白土吸着油極性画分について上記の4種類の機器分析を行い、ライブラリー検索により比較検討して、次のように化学構造を推定した^{5,6)}。

極性画分2: IRスペクトルには3,700～2,600 cm⁻¹に水酸基, 3,000～2,800, 1,460および1,380 cm⁻¹付近に炭化水素骨格に由来する強い吸収が認められ、その他に特徴的な強い吸収が確認されないことから、これらは主に高級アルコール又はステロール類に由来する吸収と推察された。さらにクロロホルム可溶物をGC/

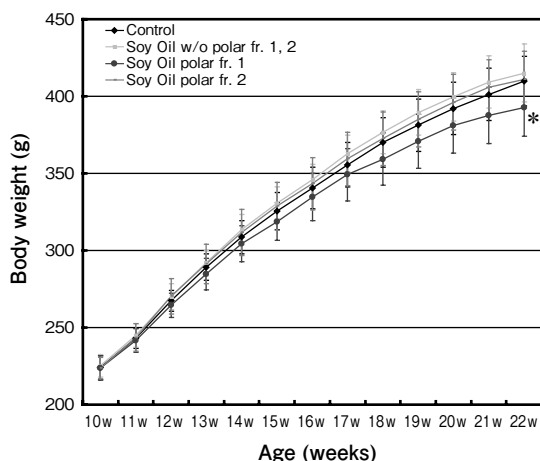


Fig. 1. Body weight increase in rats fed a diet containing polar fraction isolated from soybean oil heated at 180°C for 5 h with soy protein followed by filtration (Soy Oil), or Soy Oil free from polar fraction. Ten week old male Wistar rats were fed the diet described above for 12 weeks. Body weight increase of Soy Oil polar fr. 1 group was gradually inhibited and a significantly low value was observed at 22 weeks of age. * $p < 0.05$, significantly different from the value of control. Data were analyzed using one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison post hoc test. Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=8).

MSで全イオンクロマトグラフ分析を行い、各ピークのマススペクトルについてライブラリー検索をした結果、 β -シトステロール (Fig. 3 GC/MS ピーク④)、カンペステロール (同 ピーク②)、スチグマステロール (同 ピーク③)、ブラシカステロール (同 ピーク①) が含まれることがわかった。

極性画分1：IRスペクトルには3,700～3,100 cm^{-1} に水酸基、3,000～2,800、1,460および1,380 cm^{-1} 付近に炭化水素骨格に由来する強い吸収が認められ、極性画分2と同様に高級アルコール又はステロール類が主体と推察された。さらに、1,740 cm^{-1} 付近にエステル結合に由来する吸収ピークが認められた。従って、エステル結合を有する物質が混在しているものと考えられた。クロロホルム可溶物のGC/MS全イオンクロマトグラフ分析を行い、各ピークのマススペクトルについてライブラリー検索をした結果、 β -シトステロール (Fig. 4 GC/MSピーク④)、カンペステロール (同 ピーク②)、スチグマステロール (同 ピーク③)、ブラシカステロール (同 ピーク①) の存在は極性画分2と同様であり、さらにその他の遊離のステロール

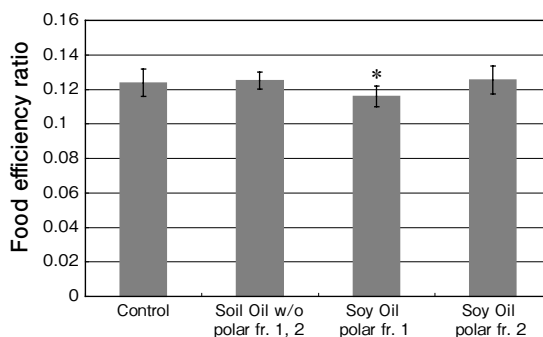


Fig. 2. Food efficiency ratio in rats fed a diet containing polar fraction isolated from soybean oil heated at 180°C for 5 h with soy protein followed by filtration (Soy Oil), or Soy Oil free from polar fraction. Ten week old male Wistar rats were fed the diet described above for 12 weeks. The food efficiency ratio of Soy Oil polar fr. 1 group was significantly low. * $p < 0.05$, significantly different from the value of control. Food efficiency ratio is calculated by dividing body weight increase with the food amount ingested in 12 weeks of the animal experiment. Data were analyzed using one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison post hoc test. Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=8).

類が含まれていた。 $^1\text{H-NMR}$ と $^{13}\text{C-NMR}$ によってもステロールの存在を確認できたが、さらにアシルグリセロール類 ($\delta 4.10 \sim 4.35$ ppm付近)、フェノール化合物 ($\delta 6.7 \sim 7.6$ ppm)、オレイン酸・リノール酸・リノレン酸等のアシルグリセロール構成脂肪酸 ($\delta 2.75 \sim 2.85$ ppm, $5.3 \sim 5.43$ ppm, $24 \sim 32$ ppm, $127 \sim 132$ ppm)、共役ジエン構造 ($\delta 5.9 \sim 6.7$ ppm) のピークも検出された。

粗原油極性画分：Fig. 5に示されるようにIRスペクトルには3,700～3,100 cm^{-1} に水酸基、3,000～2,800、1,460および1,380 cm^{-1} 付近に炭化水素骨格、1,740 cm^{-1} 付近にエステル結合にそれぞれ由来する吸収ピークが認められた。さらにクロロホルム可溶物をGC/MSで全イオンクロマトグラフ分析を行い、各ピークのマススペクトルについてライブラリー検索した結果、オレイン酸や中鎖の不飽和アルデヒドのピークが観察され、 $^1\text{H-NMR}$ と $^{13}\text{C-NMR}$ によって飽和脂肪酸 ($\delta 29$ ppmと31 ppm付近)、リノール酸・リノレン酸等の不飽和脂肪酸 ($\delta 2.75$ ppm)、フェノール化合物 ($\delta 6.7 \sim 7.6$ ppm付近)、アシルグリセロール類 ($\delta 4.2$ ppm, 4.4 ppm付近, 70 ppm付近) の存在が示唆された。

廃白土吸着油極性画分：Fig. 6に示されるようにIRスペクトルには3,700～3,100 cm⁻¹に水酸基、3,000～2,800、1,460および1,380 cm⁻¹付近に炭化水素骨格、1,740 cm⁻¹付近にエステル結合に由来する吸収ピークがそれぞれ認められた。さらにクロロホルム可溶物をGC/MSで全イオンクロマトグラフ分析を行い、各ピークのマスペクトルについてライブラリー検索した結果、パルミチン酸やオレイン酸、多数の中鎖の不飽和

アルデヒドのピークが観察され、¹H-NMRと¹³C-NMRによってアシルグリセロール類 (δ4.1～4.3 ppm, 5.25 ppm付近, 62 ppmと69 ppm付近, 173 ppm)、フェノール化合物 (δ6.7～7.6 ppm)、オレイン酸・リノール酸・リノレン酸等の不飽和脂肪酸 (δ2.0 ppm, 2.75 ppm, 127.8 ppm, 128 ppm, 129.6 ppm, 129.9 ppm, 130.2 ppm) の存在が示唆されたが、アシルグリセロール酸分解物が主体であると考えられた。

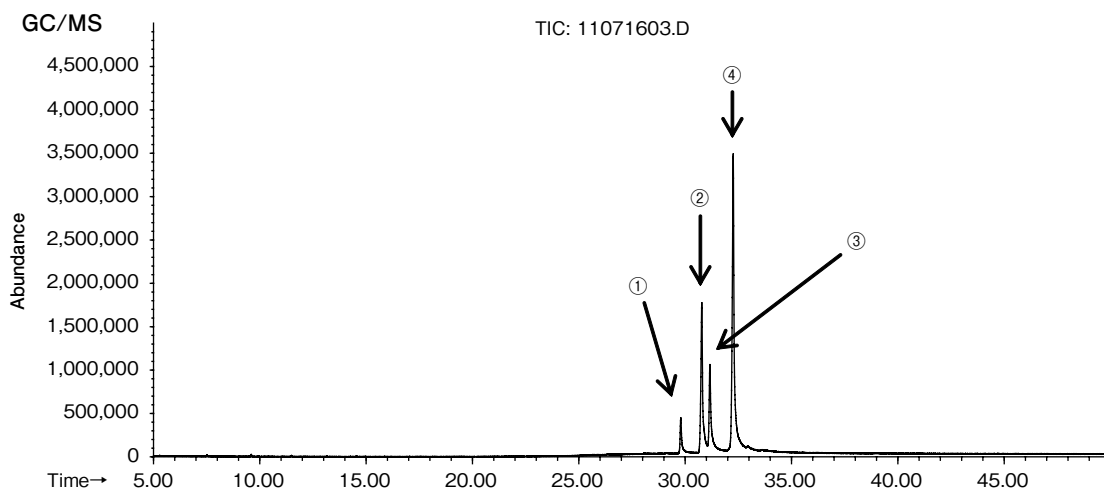
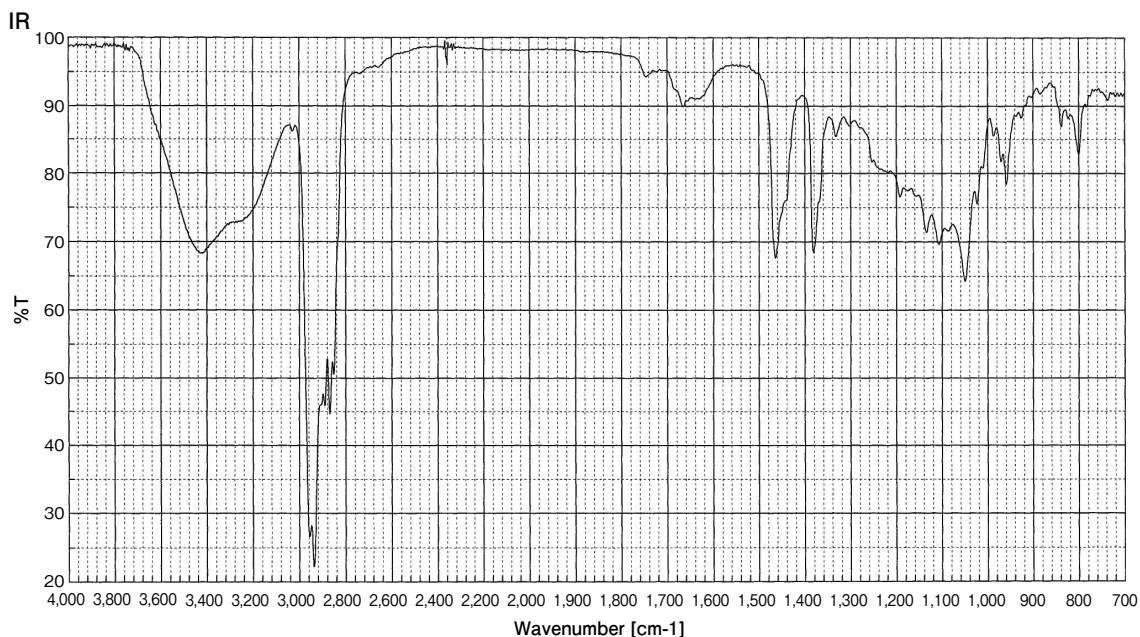


Fig. 3. IR spectrogram and GC/MS total ion chromatogram (hexane soluble components) of Soy Oil polar fr. 2.
IR: hydroxyl (3,700-2,600 cm⁻¹), hydrocarbon with branched chain (3,000-2,800 cm⁻¹, 1,460 cm⁻¹, 1,380 cm⁻¹).
GC/MS + library reference: ① brassicasterol ② campesterol ③ stigmasterol ④ β-sitosterol.

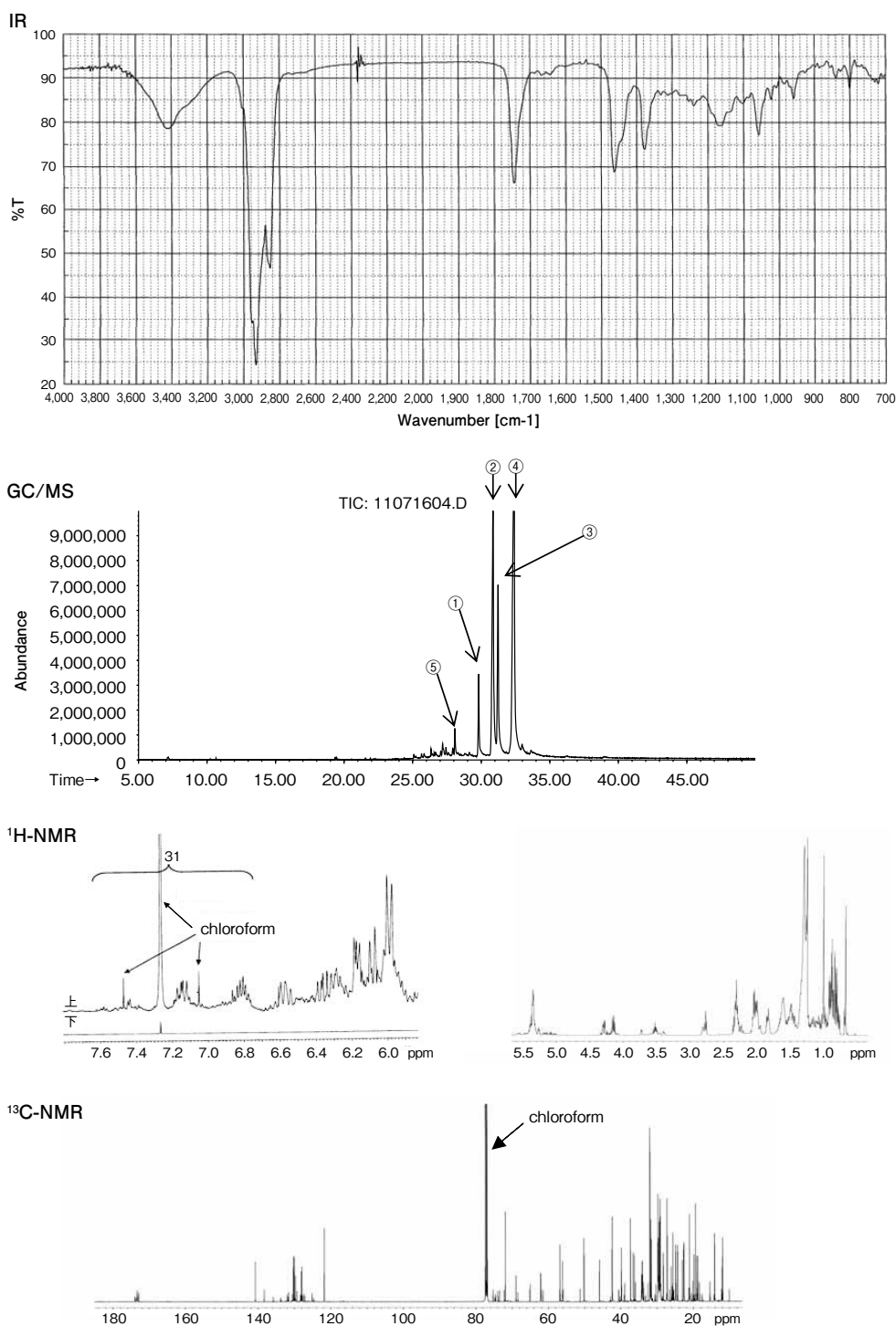
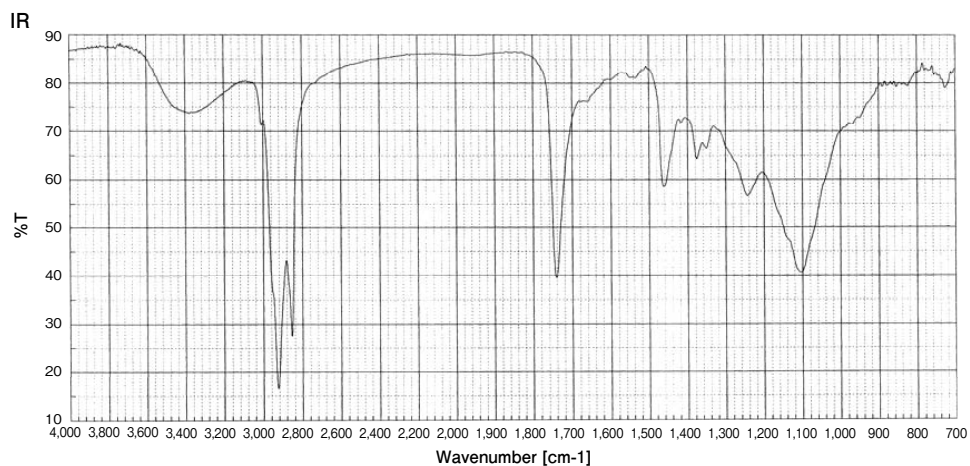
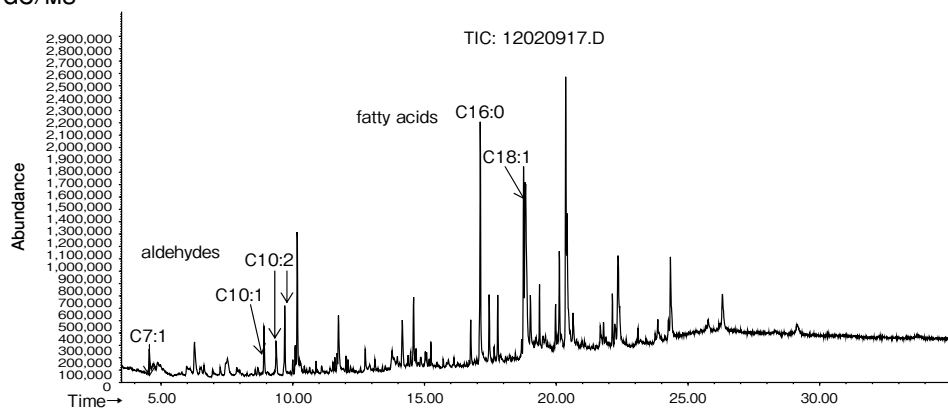


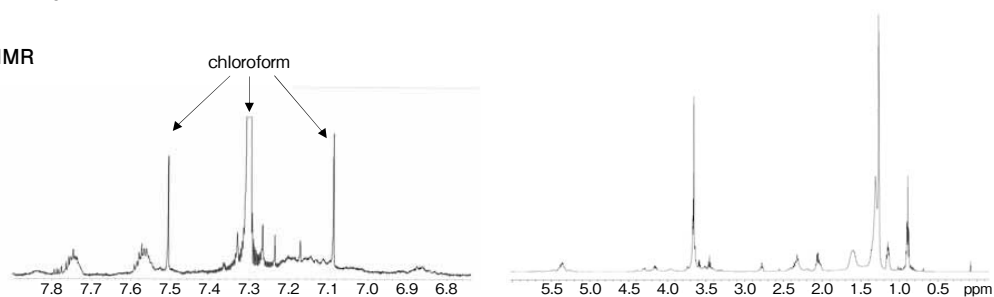
Fig. 4. Instrumental analyses of Soy Oil polar fr. 1. IR: hydroxyl (3,700-3,100 cm⁻¹), hydrocarbon with branched chain (3,000-2,800 cm⁻¹, 1,460 cm⁻¹, 1,380 cm⁻¹), ester bond (1,740 cm⁻¹). GC/MS total ion chromatogram (hexane soluble components) + library reference: ① brassicasterol ② campesterol ③ stigmasterol ④ β -sitosterol ⑤ sitosterol acetate or stigmasteryl oleate. ¹H-NMR and ¹³C-NMR: peaks derived from ①, ②, ③, ④, C18:1, C18:2 and C18:3 fatty acids, acylglycerols and phenolic compounds (δ 6.7-7.6 ppm).



GC/MS



¹H-NMR



¹³C-NMR

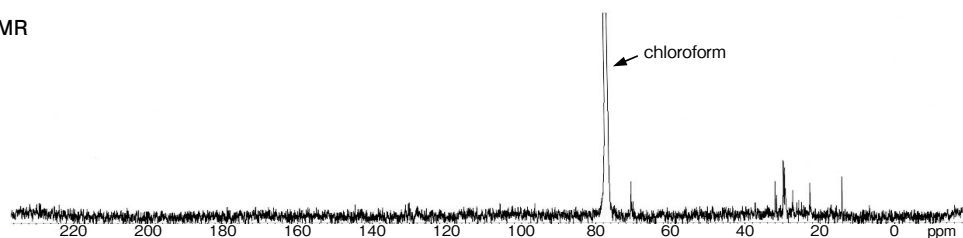
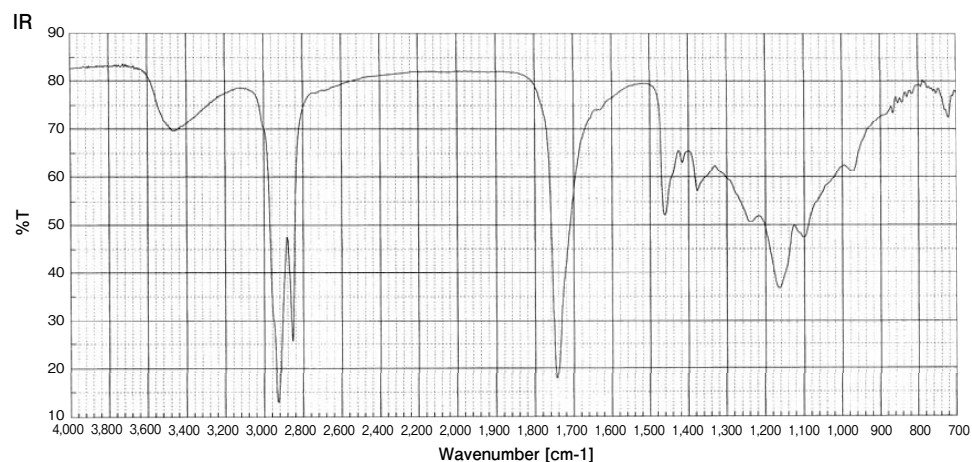
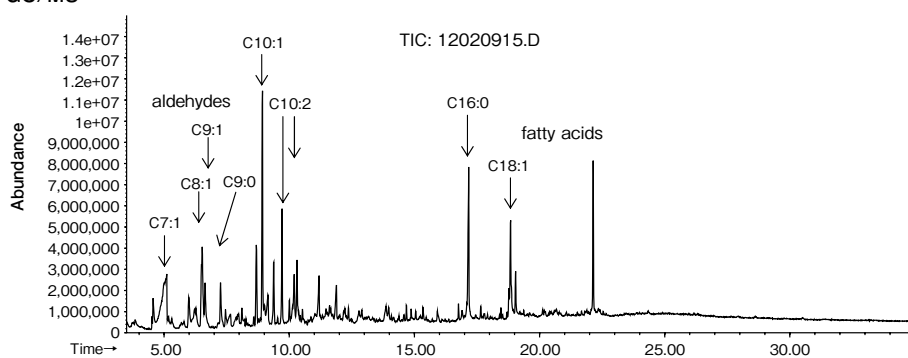


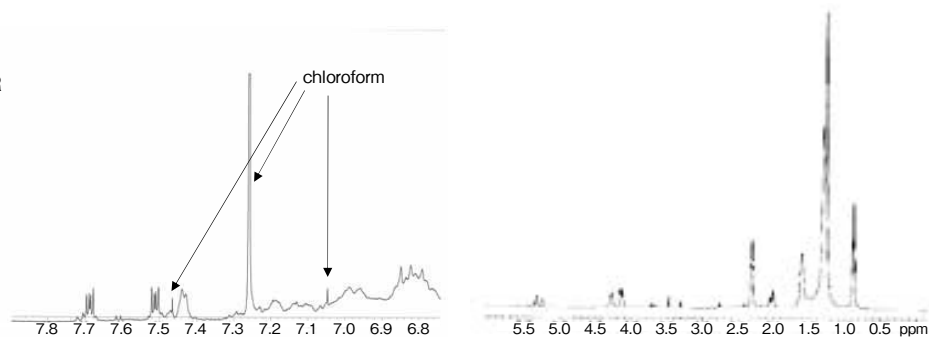
Fig. 5. Instrumental analyses of crude soybean oil polar fraction. IR: hydroxyl ($3,700\text{--}3,100\text{ cm}^{-1}$), hydrocarbon with branched chain ($3,000\text{--}2,800\text{ cm}^{-1}$, $1,460\text{ cm}^{-1}$, $1,380\text{ cm}^{-1}$), ester bond ($1,740\text{ cm}^{-1}$). GC/MS + library reference: C16:0 and C18:1 fatty acids and C7:1 - C10:2 aldehydes. ¹H-NMR and ¹³C-NMR: peaks derived from unsaturated fatty acids, acylglycerols and phenolic compounds ($\delta 6.7\text{--}7.6\text{ ppm}$).



GC/MS



¹H-NMR



¹³C-NMR

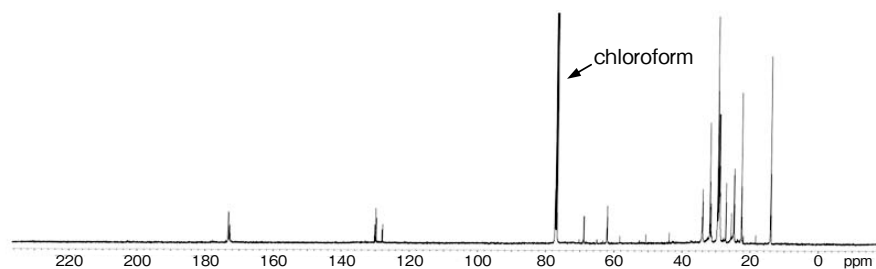


Fig. 6. Instrumental analyses of clay-adsorbed oil polar fraction. IR: hydroxyl ($3,700\text{--}3,100\text{ cm}^{-1}$), hydrocarbon with branched chain ($3,000\text{--}2,800\text{ cm}^{-1}$, $1,460\text{ cm}^{-1}$, $1,380\text{ cm}^{-1}$), ester bond ($1,740\text{ cm}^{-1}$). GC/MS + library reference: C16:0 and C18:1 fatty acids and C7:1-C10:2 aldehydes. ¹H-NMR and ¹³C-NMR: peaks derived from fatty acids, acylglycerols and phenolic compounds ($\delta 6.7\text{--}7.6\text{ ppm}$).

要 約

本研究では体重増加抑制効果を示す物質がSoy Oil極性画分1に存在することを動物飼育実験により絞り込んだ。粗原油極性画分には、Soy Oil極性画分1同様アシルグリセロールやフェノール化合物が存在し、脂肪酸も含まれていることが推定された。廃白土吸着油極性画分はアシルグリセロール類が主体でフェノール化合物も含んでいるが、二重結合の割合が著しく減少しアルデヒドが検出されたことから、酸化劣化が進行していることがわかった。以上の結果から粗原油とSoy Oilの極性成分には共通点があり、粗原油中に体重増加抑制物質が存在する可能性が示唆された。

謝 辞

情報提供と研究試料をご手配いただいた不二製油株式会社油脂加工食品開発研究所 有島俊治氏および株式会社J-オイルミルズ油脂研究所 白砂尋士氏に深謝します。

文 献

- 1) 厚生労働省平成21年国民健康・栄養調査報告
- 2) Totani N, Tateishi S, Morita A and Kida H (2010): The mechanism of weight-loss promoting effects of oil heated with vegetable protein. *J Oleo Sci*, **59**, 463-470.
- 3) Totani N, Tateishi S, Takimoto T, Maeda Y and Sasaki H (2011): Gallic acid glycerol ester promotes weight-loss in rats. *J Oleo Sci*, **60**, 457-462.
- 4) Totani N, Tateishi S, Takimoto T, Shinohara R and Sasaki H (2012): Ferulic acid esters and weight-loss promoting effects in rats. *J Oleo Sci*, **61**, 331-336.
- 5) Wilson WK, Sumpter RM, Warren JJ, Rogers PS, Ruan B and Schroepfer GR Jr (1996): Analysis of unsaturated C27 sterols by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Lipid Res*. **37**, 1529-1555.
- 6) The Board of Regents of the University of Wisconsin System. *Biological Magnetic Resonance Data Bank*: <http://www.bmrb.wisc.edu/>