

## おからの水溶性, 透析性成分の抗酸化性について\*

中 村 泰 彦

### Antioxidative Activity of Water-Soluble and Dialyzable Constituents of "Okara"

Yasuhiko NAKAMURA

食品の脂質の酸化は単独でまたは共存する他の成分との相互作用を通して, 食品の栄養価を減じ, あるいは色, 味, 香などに悪影響を及ぼしてその嗜好的価値を低下させる。その上, 酸化生成物は体内でビタミン A を破壊し, 種々の酵素を不活性化するなどにより, 生体の正常な機能に障害をもたらす。従って脂質の酸化を防止することは, 食品の製造, 貯蔵において強く要求される事柄であるだけでなく, 生化学的にも重要な課題の1つと考えられる。現在, 食品中の脂質の酸化を防止する目的で, 数種の物質の食品への添加が許可されている。しかしその中のいくつかのものは人体にとって異質な物質であるため, 生体成分あるいは食糧成分のように代謝経路が明らかであって, 食品衛生上より安全なものがあればそれを使用する方が望ましい。アミノ酸, 還元糖とアミノ酸の褐変反応生成物, メラノイジン, アミノレダクトンなどの抗酸化性<sup>1-8)</sup> はそのような立場から特に注目されている。

著者<sup>9)</sup> は, 先におから漬が塩蔵の際の肉色の劣化を阻止するのに有効であることを明らかにし, その効果は主としておから中の水溶性成分が肉のメトミオグロビンを還元することによるものと考えたが, 同時に, おから中に塩蔵した肉では脂肪の酸化が起こりにくいことを認めた。そこでおからから水溶性成分を抽出し, その抗酸化性について試験したところ若干の知見を得たので報告する。

### 実 験 方 法

#### 1. おからの水溶性, 透析性成分の調製

おからに同量の水を加えて混合し, 晒布で搾って搾汁を吸引濾過し, 濾液を5°C で, 外液を3回更新して合計4倍量の水に対して3日間透析した。得られた外液を合して40°C で減圧濃縮し, これを水溶性, 透析性成分の試料とした。また搾汁濾液を外液を取りかえながら4日間透析し, 内容物を遠心分離して上清と沈殿に分け, 上清は濃縮し, 沈殿は少量の冷水で洗って, それぞれ内液, 内液沈殿の試料とした。

#### 2. リノール酸メチルヒドロパーオキシド (MLHPO) の調製

リノール酸メチル 5g を直径 8cm のシャーレに入れ, 5°C で蛍光灯照射下に過氧化物価 (POV)

\* 1975年11月1日 受理

が2,000 となるまで酸化させた。これを石油エーテル・エタノール・水 (400:400:70) の上層と下層各 50ml を用いて6個の分液ロートで向流分配し、下層を集めて半量の水を加え、石油エーテルで抽出し、水洗、脱水後、減圧下に溶媒を除去した。この粗 MLHPO の POV は5,200 であったが、それ以上の精製は行わずに試験に供した。

### 3. 抗酸化性の測定

#### (1) 自然酸化に対する効果

50ml の三角フラスコにリノール酸 0.17g, エタノール 4 ml, 1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml, 外液または法定抗酸化剤溶液 1 ml, 水 3.8 ml を入れ混合溶解した後、ゴム栓で密閉し、45°C の恒温器中に7日または10日間放置した。この内容物をクロロホルム 10ml で抽出し、抽出液を共栓三角フラスコに取り、酢酸 15 ml と飽和ヨウ化カリウム溶液 1 ml を加えて暗所に10分間おいた後、水 30 ml を加えて 0.01 N チオ硫酸ナトリウムで滴定し、POV を求めた。法定抗酸化剤はエタノール溶液として加え、このときは外液の場合と同じ組成になるよう、水およびエタノールを加減した。また POV の経時的变化を調べるときは、300 ml の三角フラスコを使い20倍容量で反応を行なわせ、その中から 10 ml を取り同様に測定した。

#### (2) Fe<sup>2+</sup> の酸化促進作用に対する効果

リノール酸 17g, ツイーン60 2ml, 1M酢酸緩衝液 (pH 5.5) 20 ml, 水 138 ml を混合し、ホモジナイザーで3分間処理し乳化させた。この乳化液 9 ml を共栓遠心沈殿管に取り、硫酸第一鉄の50% エタノール溶液、または硫酸第一鉄と外液 (または法定抗酸化剤) との混合液 (エタノール50%) 1ml を加え、20秒間激しく振って混合し、30°C の恒温器中に放置した。所定時間後、これにクロロホルム 10ml を加えて30秒間振とうし、直ちに1分間遠心分離して下層をピペットで吸い取り、常法により POV を求めた。

(1), (2) のいずれにおいても、試薬濃度は反応液中の終濃度で示し、透析液の場合はその中の固形物の濃度として表わした。酸化程度の指標には POV のほか試験の POV の対照のそれに対する百分率 (POV%) を用いた。

### 4. 水素供与性の測定

2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) 8 mg を 50ml のエタノールに溶解し、これに 50ml の水を加え汙過して調製した DPPH 溶液 5 ml を共栓遠心沈殿管に取り、外液または法定抗酸化剤のエタノール溶液 2.5ml, エタノール (法定抗酸化剤添加のものは水) 2.5 ml を加えて振とう混合し、528 nm の吸光度を測定した。

### 5. 過酸化分解能の測定

100ml の三角フラスコに粗 MLHPO のエタノール溶液 (3.2g/100ml) 7.5ml, エタノール 16.5ml, 1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 6 ml, 水 24ml, 外液 6ml を取り混合溶解し、ゴム栓をして 30°C の恒温器中におき、所定時間にその 10 ml を取り出して 10 ml のクロロホルムで抽出し、常法により POV を測定した。

## 実験結果および考察

### 1. 透析性成分の抗酸化力

大豆中に含まれる抗酸化性成分としては、トコフェロール、フラボノイド、アミノ酸、SH化合物などが考えられ、さらに大豆を加熱した場合にはアミノ・カルボニル反応の中間生成物やメラノイジンなどができる可能性がある。おからは大豆磨砕物を加熱後圧搾した搾りかすであるので、可溶性成分は大部分が損失しているが、なお数パーセントの水溶性および脂溶性成分が残っており、この中に抗酸化性成分が残存することは十分期待できる。

しかしおからのクロロホルム・メタノール(1:1)抽出固形物のうち、クロロホルム・メタノール(2:1)に可溶性成分はリノール酸に対してほとんど抗酸化性を示さなかったため、水で抽出される成分を透析し、外液、内液、内液沈殿に分け抗酸化力を調べた。Fig. 1に示すように外液、内液にはかなり強い抗酸化作用があることが認められたが、内液沈殿は弱かった。外液は内液よりやや弱い傾向がみられたが、おからからの収量がよいので、以下外液を試料として試験した。

濃度別にみると(Fig. 2)、0.2%添加でPOVの上昇は3週間以上抑制された。比較的低い濃度でも、初期のPOVの上昇はかなり抑えられた。その抗酸化力を法定抗酸化剤と比較すると(Tab. 1)、2,6-ジ-tert.-ブチル-p-クレゾール(BHT)の1/100, tert.-ブチル-4-ヒドロキシアニソール(BHA)の1/100以上、グアヤク脂(GG)の1/100~1/10, ノルジヒドログアイアレン酸(NDGA)の1/10, 没食子酸プロピル(PG)の1/10以上となり、いずれよりも弱かったが、グルコースとリジ

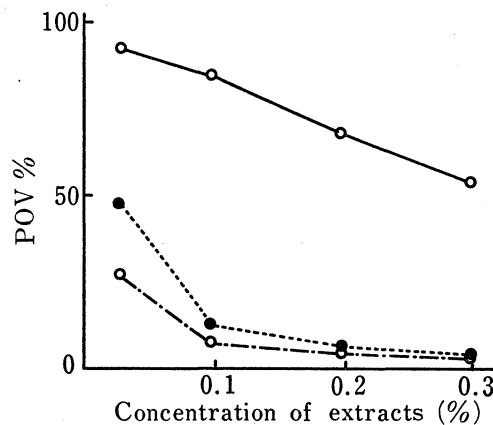


Fig. 1. Antioxidative Activity of Water Extracts.

A mixture of linoleic acid (0.17 g), an aqueous sample solution (1 ml), ethanol (4 ml), 1M potassium phosphate buffer (1 ml, pH 7.0) and water (3.8 ml) was incubated in a tightly stoppered 50 ml flask at 45°C for 10 days. The incubated mixture was extracted with 10 ml of chloroform, and the peroxide value (POV) of the extract was measured by a general iodide-acetic acid method. The control experiment was carried out by addition of water (1 ml) instead of the sample solution. Antioxidative activity was represented as  $POV\% \left( \frac{POV \text{ of sample}}{POV \text{ of control}} \times 100 \right)$ . ●.....● outer solution, ○- - - -○ inner solution, ○—○ precipitate.

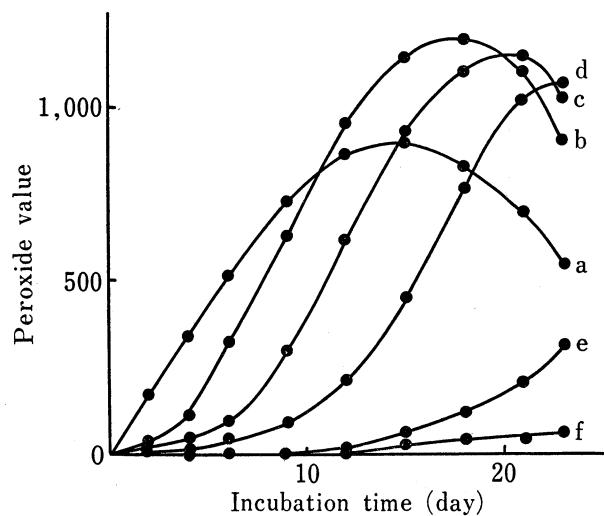


Fig. 2. Antioxidative Activity of Dialyzable Constituents.

A 100 ml of the mixture of the same composition as in Fig. 1 was incubated in a 300 ml flask. At 2 or 3-day intervals, the POV of 10 ml aliquots was measured. a: control, b: 0.01%, c: 0.025%, d: 0.05%, e: 0.1%, f: 0.2%.

**Table 1.** Comparison of Dialyzable Constituents with Legal Antioxidants.

Antioxidants	POV <sup>o/c)</sup>			
	Final concentration of antioxidants (%)			
	0.0001	0.001	0.01	0.1
D. C. <sup>a)</sup>	100	85	81	7
BHA <sup>b)</sup>	95	7	6	9
BHT <sup>b)</sup>	80	4	3	3
GG <sup>b)</sup>	97	21	6	2
NDGA <sup>b)</sup>	101	80	8	9
PG <sup>b)</sup>	101	96	21	5

a) The reaction mixture was prepared as shown in Fig. 1.

b) Water (1 ml) and legal antioxidants in ethanol (4 ml) were added instead of the sample solution and the ethanol, respectively.

c) Incubation was carried out for 7 days.

D. C.: dialyzable constituents, BHA: *tert*-butyl-4-hydroxyanisole,

BHT: 2, 6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol, GG: guaiac gum,

NDGA: nordihydroguaiaretic acid, PG: gallic acid *n*-propylester.

ンとの褐変反応生成物のアセトン抽出物の抗酸化力<sup>10)</sup>の1/2, 非透析性褐変物 (メラノイジン) のそれ<sup>8)</sup>の1/2以上と推定され, 食品成分由来のものとしてはそれ程弱くない。

## 2. 水素供与性

一般に抗酸化剤の作用機作としては, フリーラジカルの捕捉, 過酸化物の分解, 金属の不活性化などが考えられている。そこで外液の抗酸化性発現の機作を追究するための手懸りとして, まずその水素供与性を DPPH 法により測定した。結果は Fig. 3 に示したように, 外液の DPPH との反

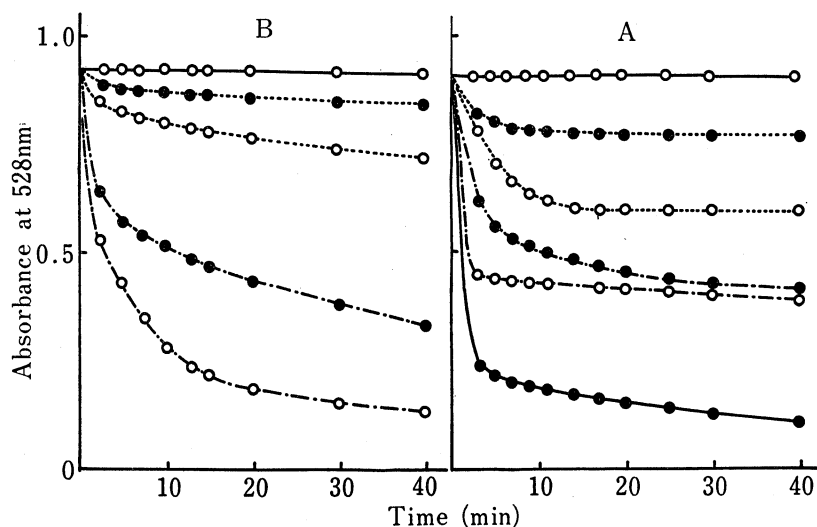


Fig. 3. Reactivity of Dialyzable Constituents and Legal Antioxidants with DPPH.

To 5 ml of 100mg% solution of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl in 50% ethanol was added 5 ml of 50% ethanol containing a legal antioxidant (A) or an outer solution (B), and the absorbance of the mixture was periodically measured at 528 nm.

A: The concentration of the antioxidant was 0.0003%. ○—○ dialyzable constituents, ●·····● GG, ○·····○ BHT, ●—● BHA, ○—○ NDGA, ●—● PG.

B: The concentration of the dialyzable constituents was as follows. ○—○ 0.01%, ●·····● 0.03%, ○·····○ 0.1%, ●—● 0.3%, ○—○ 1.0%.

応性は非常に弱く、終濃度0.01%でもリノール酸の初期酸化はかなり抑えられている (Fig. 2) にもかかわらず、DPPH の脱色はほとんど認められなかった。0.3%の外液と0.0003%の法定抗酸化剤における30分後の吸光度の減少量から計算すると、外液のDPPH脱色力は、同一固形物重量当りで、PGの1/1472、NDGAの1/943、BHAの1/906、BHTの1/585、GGの1/264となり、同じ抗酸化力を示す濃度に換算しても上記法定抗酸化剤の1/100~1/10である。従って外液の場合、フリーラジカル捕捉作用の抗酸化作用への寄与は非常に小さいと考えられる。またDPPHとの反応速度は遅く、この点はBHAに類似しており、PG、NDGAなどのエンジオール構造を持つものが瞬時に反応するのとはかなり異なっている。

### 3. $Fe^{2+}$ の酸化促進作用に対する効果

$Fe^{2+}$ をはじめ  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  などの金属イオンが油脂や脂肪酸の酸化を促進することは広く知られている。金属封鎖作用のある化合物はそのような酸化に対して阻止効果があり、実際クエン酸などは抗酸化剤あるいはシネルギストとして使用されている。外液にもそのような効果が期待できるので、 $Fe^{2+}$ により触媒される酸化に対する外液の影響を調べた。第一鉄塩がエタノールに溶解しにくいので、基質としては乳化剤を加えて乳化したリノール酸を用いた。

リノール酸のエマルジョンに硫酸第一鉄を  $10^{-4}M$  となるように加えると、直ちにリノール酸の酸化が始まり、POVは急に上昇し、20分前後に極大値に達した。その後のPOVの変化は複雑であるが、 $Fe^{2+}$ を加えないものは30分間に10%程度の割合で直線的に増加するにすぎないので、少

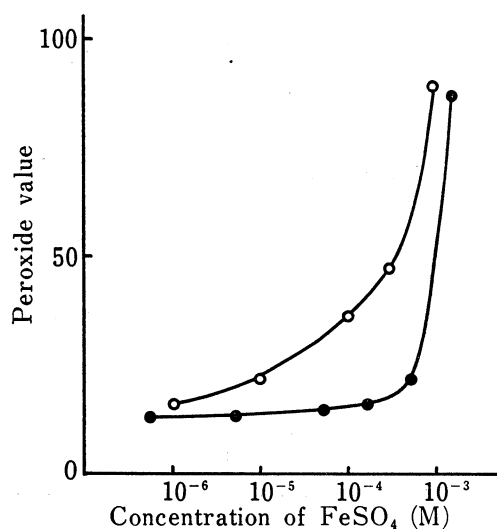


Fig. 4. Inhibition of  $\text{Fe}^{2+}$ -Catalyzed Oxidation by Dialyzable Constituents.

A mixture of linoleic acid (17 g), Tween 60 (2 ml), 1M acetate buffer (20 ml, pH 5.5) and water (138 ml) was homogenized for 3 min, and 9 ml of the resulting emulsion was placed in a centrifuge tube with a glass stopper. Then 1 ml of a ferrous sulfate solution or 1 ml of an outer solution mixed previously with ferrous sulfate was added. The contents were mixed by shaking for 20 sec, allowed to stand at  $30^\circ\text{C}$  for 20 min, and extracted with 10 ml of chloroform. The POV of the extract was measured as in Fig. 1.  $\bigcirc$ — $\bigcirc$   $\text{Fe}^{2+}$  only,  $\bullet$ — $\bullet$   $\text{Fe}^{2+}$  plus outer solution.

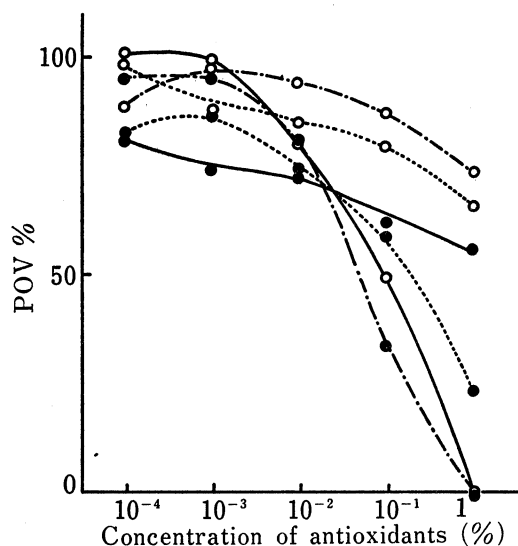


Fig. 5. Inhibitory Effect of Antioxidants on  $\text{Fe}^{2+}$ -Catalyzed Oxidation.

Antioxidative materials in 50% ethanol solution were added instead of the outer solution in Fig. 4. The final concentration of ferrous sulfate was  $10^{-4}$  M.  $\bigcirc$ — $\cdot$ — $\bigcirc$  GG,  $\bigcirc$ — $\cdot$ — $\bigcirc$  BHT,  $\bullet$ — $\bullet$  BHA,  $\bullet$ — $\cdot$ — $\bullet$  PG,  $\bigcirc$ — $\bullet$ — $\bigcirc$  NDGA,  $\bullet$ — $\cdot$ — $\bullet$  outer solution.

なくとも初期の、急激な上昇は、専ら  $\text{Fe}^{2+}$  の作用によるものであることがわかる。そこで添加する  $\text{Fe}^{2+}$  の濃度をかえて30分後の POV を測定すると、Fig. 4 のように、対照は  $\text{Fe}^{2+}$  の濃度と共に POV が高くなったが、外液を加えたものは  $2 \times 10^{-4}$  M 付近まではほとんど上昇せず、外液が  $\text{Fe}^{2+}$

の酸化促進作用を阻止していることが認められた。外液の  $\text{Fe}^{2+}$  不活性化力は、0.02% 以上では試験した法定抗酸化剤のいずれよりも強く、またその濃度による変化のパターンはジフェノールである NDGA に似ていた (Fig. 5)。しかし NDGA などのジフェノールは  $\text{Fe}^{2+}$  とキレートを形成し強く呈色することが知られており、事実、NDGA と PG は硫酸第一鉄溶液と混合したとき青色に呈色したが、外液ではそのような変化は認められなかったので、隣接して水酸基を持つポリフェノールである可能性は薄い。

#### 4. 過酸化物分解能

自動酸化の過程で生成する過酸化物の分解には、フリーラジカルを生成する分解と非ラジカル性生産物を生じる分解とがある。後者の場合は新たなラジカルの生成が阻害されるので、酸化反応の進行は抑制される。還元糖とアミノ酸との褐変反応生成物<sup>11)</sup>やビタミン  $\text{B}_2$  の酪酸エステル<sup>12)</sup> の抗酸化性の一部はこれに基づくものと解されている。

MLHPO の含水エタノール溶液に外液を加えて放置したときの POV は Fig. 6 のようになり、

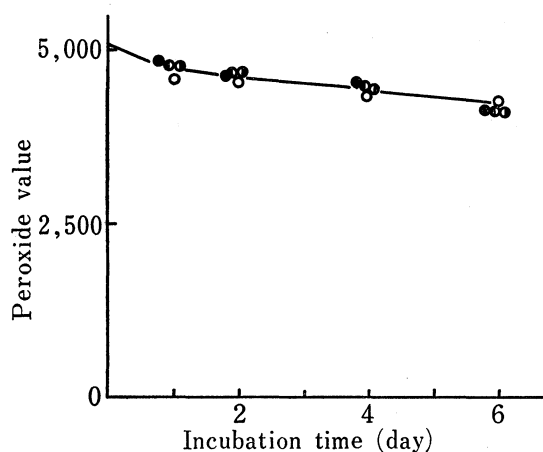


Fig. 6. Effect of Dialyzable Constituents on MLHPO.

Crude methyl linoleate hydroperoxide (MLHPO, 0.43 g) in ethanol (7.5 ml), ethanol (22.5 ml), an outer solution (7.5 ml), 1M potassium phosphate buffer (6 ml, pH 7.0) and water (18 ml) were placed in a 100 ml flask, and the flask was tightly stoppered and kept at 30°C in the dark. Each 10 ml of the mixture was withdrawn and its POV was measured.

●—● control, ◐—◐ 0.1%, ●—● 0.5%, ○—○ 2%.

2% 添加で最初対照よりわずかに低くなったにすぎず、全体として対照との大きな差は認められなかった。反応液中の MLHPO に対する外液固形物の割合は、外液固形物の平均分子量を 200 とすると、0.1, 0.5, 2% の場合がそれぞれ 0.23/1, 1.1/1, 4.5/1 のモル比となる。2% 濃度では外液の量は MLHPO に対し十分であると考えられるので、少なくともこのような系では、外液は過酸化物分解能を持たないといえる。

これらの結果からみると、外液の抗酸化作用は主としてその金属不活性化作用を通して発揮されていると考えるのが妥当であろう。しかし外液を薄層クロマトグラフィーにかけると、多くのアミ

ノ化合物、フェノール性化合物、カルボニル化合物、有機酸などが検出されるので、それらの相乗効果も無視できないと思われるが、これに関しては外液を分画精製した上で検討する必要がある。

## 要 約

おからの水抽出液を透析して得た透析性成分の抗酸化性をリノール酸を用いて試験し、数種の法定抗酸化剤と比較した。

透析性成分の0.2%添加でPOVの上昇は45°Cで3週間以上阻止された。より低い濃度でも初期のPOVの上昇はかなり抑制された。その抗酸化力は、POV%から推測すると、概略BHT、BHAの1/100、GGの1/100~1/10、NDGAの1/10、PGの1/10以上であった。DPPHとの反応性は非常に弱く、過酸化分解能もほとんど認められなかったが、Fe<sup>2+</sup>不活性化作用が大で、0.1%添加ではFe<sup>2+</sup>によるリノール酸酸化をBHT、BHA、GG、NDGA、PGのいずれよりも強く抑制した。

## 文 献

- 1) R. Marcuse: *Nature*, **183**, 886 (1960).
- 2) 満田久輝, 安本教伝, 岩見公和: 栄養と食糧, **91**, 210 (1966).
- 3) 山口直彦, 横尾良夫, 小山吉人: 食工誌, **11**, 184 (1964).
- 4) N. Kirigaya, H. Kato and M. Fujimaki: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 289 (1968).
- 5) 畑中千秋, 大村浩久: 栄養と食糧, **26**, 457 (1973).
- 6) C. D. Evans, H. A. Moser, P. M. Cooney and J. E. Hodge: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **35**, 84 (1958).
- 7) 小幡 斉, 佐藤英二, 徳山 泰: 農化, **45**, 489 (1971).
- 8) 桐ヶ谷紀昌, 加藤博通, 藤巻正夫: 農化, **43**, 484 (1969).
- 9) 中村泰彦: 鹿大教育学部研究紀要 自然科学篇, **26**, 11 (1975).
- 10) 山口直彦, 小山吉人: 食工誌, **14**, 281 (1967).
- 11) 山口直彦, 岡田安司: 食工誌, **15**, 187 (1968).
- 12) 戸谷洋一郎, 戸谷永生, 松尾 登: 栄養と食糧, **28**, 41 (1975).

## Summary

The antioxidative activity of the dialyzable constituents which were obtained by dialysis of a water extract from "Okara", was investigated using linoleic acid as substrate, and compared with that of some legal antioxidants.

In case of 0.2% constituents in a reaction mixture, no increase in the peroxide value was found at 45°C for more than 3 weeks. Even in a lower concentration, the rise of the peroxide value was suppressed in the initial stage of oxidation. The antioxidative potency was estimated to be about 1/100 of both BHA and BHT, 1/100 to 1/10 of GG, 1/10 of NDGA, and more than 1/10 of PG. The constituents reacted very weakly with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, and scarcely decomposed methyl linoleate hydroperoxide. On the other hand, they inhibited more strongly the oxidation of linoleic acid catalyzed by Fe<sup>2+</sup> than the legal antioxidants examined.