

## おからに含まれる抗酸化性成分の分画

中 村 泰 彦

### Fractionation of Antioxidative Constituents of "Okara"

Yasuhiko NAKAMURA

前報<sup>1)</sup>で、おからから水で抽出される透析性成分がリノール酸の酸化を抑制することを示し、これが水素供与性や過酸化分解能は小さいが、鉄の酸化促進作用を強く阻害することを明確にした。しかし、透析外液は多くの低分子成分を含むので、その抗酸化性の本体を明らかにするためには、外液を分画する必要がある。この目的で分画法を種々検討したところ、DEAE-セルロース、セファデックス G-10、セルロース薄層の各クロマトグラフィーを組合せた方法で、抗酸化性成分をある程度まで分別することができたので、その結果を報告する。

### 実 験 方 法

#### 1. DEAE-セルロースによる分画

0.5 M HCl と 0.5 M NaOH で再生し  $\text{PO}_4$  型とした DEAE-セルロース (ブラウン) を  $2.8 \times 20\text{cm}$  のカラムに詰め、0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で十分に洗ったのち、固形物含量 3~12%のおからの透析外液 10ml を吸着させ、0.02 M, 0.1 M, 0.5 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) と 0.1 M NaOH で順次溶出させた。溶出液は 10ml ずつ分取し、280nm の吸収と抗酸化力を測定した。

#### 2. 抗酸化力の測定

##### (1) リノール酸の含水エタノール溶液を基質とする場合

100ml の三角フラスコに、満田らの方法<sup>2)</sup>により調製したリノール酸 (半井化学) のエタノール溶液 10ml, DEAE-セルロースによる分画液 2ml, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 8ml を取り混合したのち、ゴム栓をして  $37^\circ\text{C}$  の恒温器中に放置した。3日後にその 0.05ml を取り、ロダン鉄法<sup>2)</sup>により過酸化物を定量した。

##### (2) 大豆油乳化液を基質とする場合

大豆油 (半井化学) 20g に 0.5g のツイーン40と 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて 80ml とし、ユニバーサルホモジナイザーで90秒間処理し乳化させた。分離しないようにスターラーで攪拌しながら、その 4ml を 100ml の三角フラスコに取り、DEAE-セルロースによる分画液 1ml またはセファデックス G-10 による分画液 2ml を加え、激しく振って全体を乳化させ、これに濾紙粉末 (東洋濾紙、濾紙粉末 A) 2g を加えて乳化液を吸収させた。栓をしないで  $60^\circ\text{C}$  の恒温器中に7日間置いたのち、酢酸-クロロホルム (3:2) 混液 25ml を加えて油脂を溶かし、飽和ヨウ化

カリウム溶液 1ml を加えて暗所に10分間放置したのち、0.01 N チオ硫酸ナトリウムで滴定した。薄層クロマトグラフィーによる分離成分の抗酸化力測定は、薄層からの成分の抽出を行わず、分離成分を含む薄層をそのまま用いて行なった。すなわち、展開後風乾した薄層を Rf 値により10等分してはぎ取り、そのまま、または残存フェノールをエーテルで抽出除去したのち濾紙粉末 2g と混合し、乳化液を吸収させた。

### 3. セファデックス G-10 による分画

1.7×100 cm のセファデックス G-10 カラムに、DEAE-セルロースによる分画液の濃縮物 7 ml をのせ、流速 60ml/hr で水、0.1 M NaOH, 0.1 M HCl で順次溶出させた。溶出液は 10ml または 5ml ずつ分取し、280nm または 265nm の吸収と抗酸化力を測定した。

### 4. 薄層クロマトグラフィーによる分画

薄層は 20×20cm のガラス板にセルロース (メルク, セルロースマイクロクリスタリン) で 0.5mm の厚さに作り、室温で風乾して用いた。セファデックス G-10 による分画液を濃縮してその 0.075 ml を原線の上に線状に塗布したのち、両端を 0.5cm 幅で削り落として展開させた。展開溶媒は *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5) またはフェノール-水 (3:1) を、展開後の成分の検出には主にニンヒドリン試薬とアンモニア性硝酸銀試薬を用いた。

### 5. アミノ酸分析

日本電子製 JLC-6AH 型アミノ酸自動分析計により行なった。

## 実験結果および考察

### 1. 透析外液の分画と画分の抗酸化力

食品の油脂は、いわゆる食用油のようにほぼ油脂 100% で連続した均一な相を作っている場合もあるが、食品組織中で溶け合わない他の成分により隔てられ、乳化したり、不均一に分散したりして存在する場合も多い。このような食品では、油脂の酸化の様子も溶液状態とは多少とも異なってくると思われる。また、同じ物質の抗酸化力も基質や測定法の違いにより変わることが知られている。そこで乳化状態の 1 つのモデルとして、乳化剤を用いて水と大豆油を混合、乳化し、濾紙粉末に吸収させたものを作り、これをリノール酸の含水エタノール溶液と共に酸化の基質として使った。

予備試験により、おから外液の成分は DEAE-セルロースクロマトグラフィーによってよく分別できることが確かめられたので、まず DEAE-セルロースで分画した (Fig. 1, Fig. 2)。大豆油乳化液-ヨード滴定法では、主な抗酸化性成分は画分 No. 11~14 (A) および No. 81~87 (B) に溶出してくることが認められた。また No. 23, 35, 46, 59, 77 など弱いながら酸化抑制的であった。一方、リノール酸含水エタノール溶液-ロダン鉄法では主に No. 12~17 および No. 105~107 画分 (C) で低い吸収値が得られた。0.5 M リン酸緩衝液で溶出される画分も試料により非常に低い値を与えることがある。そのような画分や画分 C は、リノール酸溶液に添加しインキュベートするこ

とにより混合液中に浮遊性の凝固物または沈殿を生成するが、混合液の pH, アルコール濃度, 温度などを変えて不溶物が生じない状態におくと, 吸収値は上昇する。従って, これらの画分は必ずしもリノール酸の酸化を直接抑制するのではなく, 溶液中のリノール酸を不溶化するなどにより, ロダン鉄法における吸収値を低くしていると思われる。ちなみに画分 C は大豆油乳化液-ヨード滴定法では多少酸化促進的であった。

画分 A を集めて濃縮後, セファデックス G-10 により再分画した結果, Fig. 3 に示すように, 有効成分は No. 14 (A<sub>1</sub>) 前後に溶出し, 抗酸化力最大の部分は最初の紫外吸収ピークの位置と一致した。画分 B および C のセファデックス G-10 ゲル濾過パターンは Fig. 4, Fig. 5 に示した。B の有効成分は No. 14 に溶出しているが, 抗酸化力はそれほど大きくない。また C の沈殿形成性成分は 3 番目の紫外吸収ピークの位置に集中して溶出したが, 大豆油乳化液に対しては酸化抑制的ではなかった。

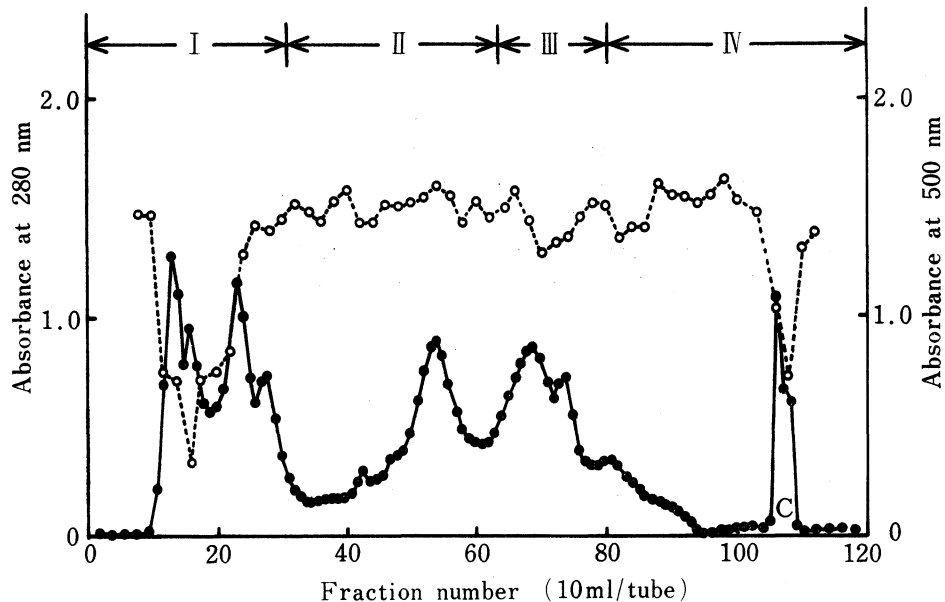


Fig. 1. Column Chromatography Pattern of Dialyzable Constituents of "Okara" on DEAE-Cellulose and Antioxidative Activity of Each Fraction for Linoleic Acid.

A 10 ml of the outer solution, which was obtained by dialyzing a water-extract of "Okara" and concentrated to a solids content of 3%, was applied to a column (2.8×20 cm) equilibrated with 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0), and eluted at a flow rate of 50 ml/hr by exchanging stepwise the concentration or the pH of eluents as follows: I, 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0); II, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); III, 0.5 M phosphate buffer (pH 7.0); IV, 0.1 N NaOH. The fraction volume was 10 ml.

A mixture containing an aqueous ethanol solution of linoleic acid (10 ml), eluates (2 ml), and 0.1 M phosphate buffer of pH 7.0 (8 ml) was incubated in a tightly stoppered 100-ml flask at 37°C for 3 days. After the incubation, an aliquot (0.05 ml) was withdrawn, and the peroxide content in it was estimated by ferric-thiocyanate method. Antioxidative activity is indicated by the decrease in absorbance at 500 nm.

●—●, absorbance at 280 nm; ○---○, absorbance at 500 nm.

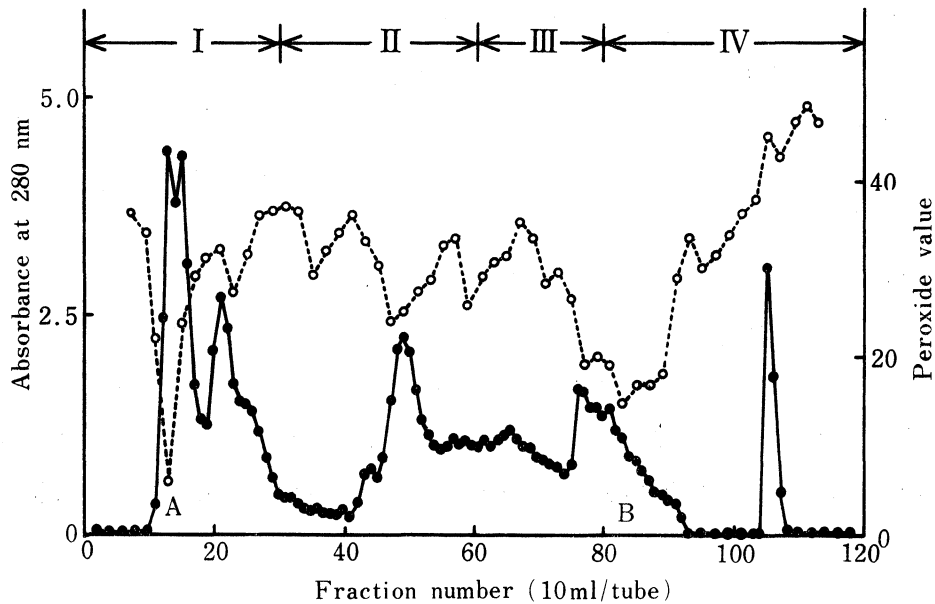


Fig. 2. Column Chromatography Pattern of Dialyzable Constituents of "Okara" on DEAE-Cellulose and Antioxidative Activity of Each Fraction for Soybean Oil.

A sample of solids content of 12% was applied to the column. Chromatographic conditions were the same as in Fig. 1. Fractions No. 11~14 (A), No. 81~87 (B), and No. 105~107 (C) were pooled for the subsequent step on repeated runs.

A mixture containing soybean oil (20 g), Tween 40 (0.5 ml), and 0.1 M phosphate buffer of pH 7.0 (18 ml) was homogenized with the universal homogenizer for 90 sec. The resulting emulsion (4 ml) and eluates (1 ml) were pipetted in a 100-ml flask, mixed vigorously, and then cellulose powder (2 g) was added to the flask. After the incubation of 7 days at 60°C, a chloroform-acetic acid (2:3) mixture (25 ml) was added, and the peroxide value was estimated by iodometric method.

●—●, absorbance at 280 nm; ○……○, peroxide value.

これらのことから、おからの透析外液中の抗酸化性成分のうち主要なものは  $A_1$  に含まれていると考えられた。そこで、 $A_1$  を集め濃縮して *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5) を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィーにより分画した。最も強い抗酸化性は  $R_f$  0.1~0.2 のバンドに現われ、 $R_f$  0.2~0.3 の部分も強い抗酸化性を示した (Fig. 6a)。この2つの部分はニンヒドリン反応陽性の物質を含むが、同時にアンモニア性硝酸銀でも呈色した。 $R_f$  0.1~0.2 の成分 ( $A_2$ ) をフェノール-水 (3:1) を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィーにかけると、さらにいくつかのニンヒドリン反応陽性の成分とアンモニア性硝酸銀反応陽性の成分に分離したが (Fig. 6b), 抗酸化性は主として  $R_f$  0.2~0.3 ( $A_3$ -I), 0.3~0.4 ( $A_3$ -II) および 0.7~0.8 ( $A_3$ -III) の部分に認められた。

## 2. 含有アミノ酸と外液の抗酸化性

$A_1$  から  $A_3$  までの試料をセルロース薄層クロマトグラフィーにより展開すると Fig. 7 のようになり、 $A_3$ -III は  $R_f$  0.7~0.8 のニンヒドリン反応陽性のスポットが主成分であると思われたが、 $A_3$ -I,  $A_3$ -II はなお多くの成分が混在していて、主要成分の判別はできなかった。しかし、アンモ

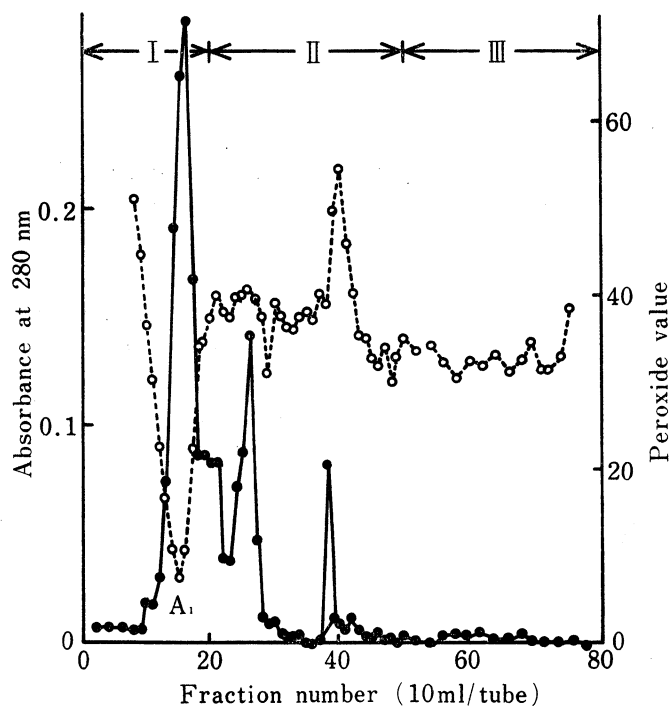


Fig. 3. Gel-Filtration Pattern of Fraction A on Sephadex G-10 and Antioxidative Activity of Each Fraction.

A 7 ml of the concentrated solution of fraction A (Fig. 2) was applied to a column (1.7×100 cm) of Sephadex G-10, and eluted successively with water (I), 0.1N NaOH (II), and 0.1N HCl (III) at a flow rate of 60 ml/hr. Fractions of 10 ml were collected. The determination of antioxidative activity was the same as in Fig. 2 except that 2 ml of the eluates was added. Fraction No. 14 (A<sub>1</sub>) was pooled for the subsequent step.

●—●, absorbance at 280 nm;  
○---○, peroxide value.

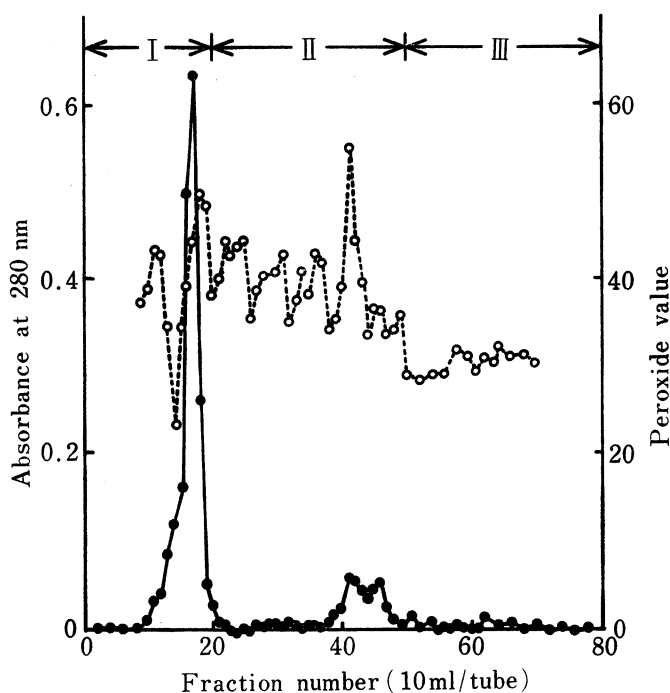


Fig. 4. Gel-Filtration Pattern of Fraction B on Sephadex G-10 and Antioxidative Activity of Each Fraction.

Experimental conditions were the same as in Fig. 3.

●—●, absorbance at 280 nm;  
○---○, peroxide value.

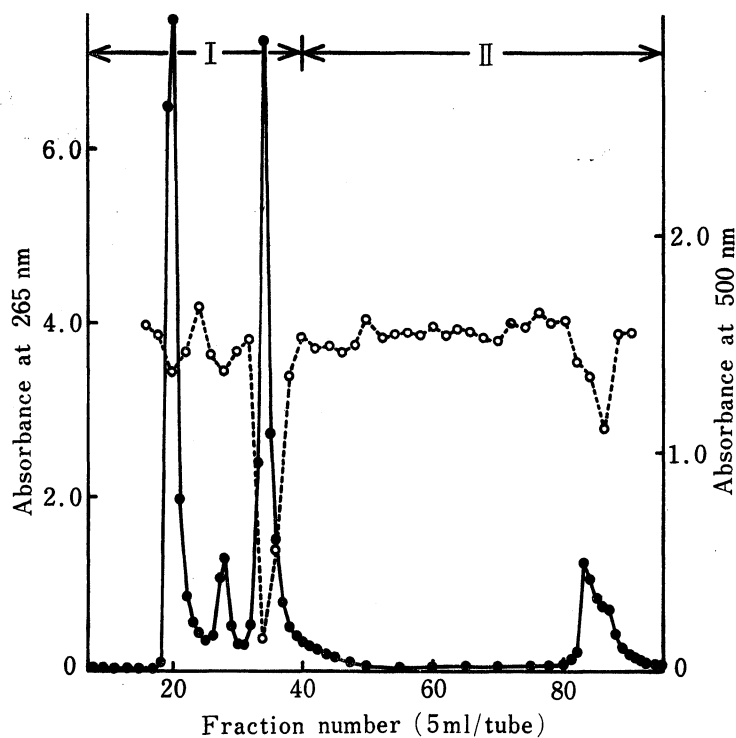


Fig. 5. Gel-Filtration Pattern of Fraction C on Sephadex G-10 and Antioxidative Activity of Each Fraction.

Gel-filtration was carried out by the method described in Fig. 3. The determination of antioxidative activity was the same as in Fig. 1.

●—●, absorbance at 265 nm;  
○---○, peroxide value.

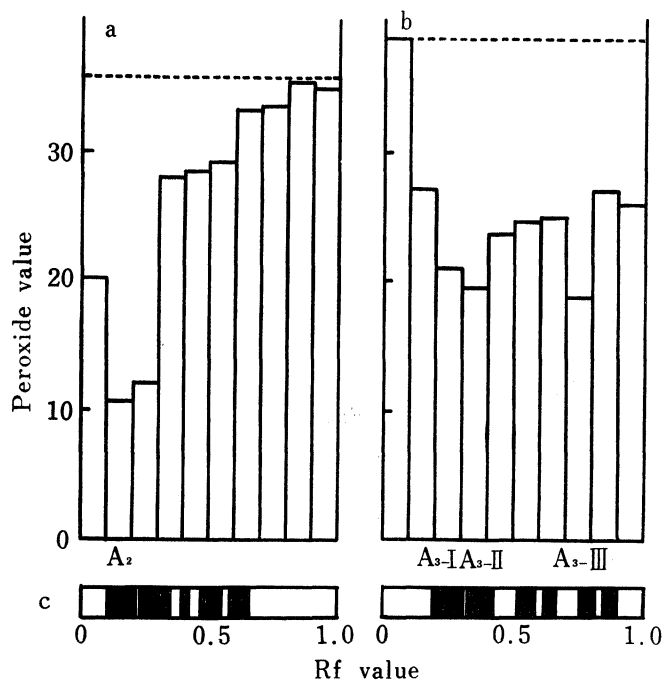


Fig. 6. Fractionation of Antioxidative Activities of Fractions  $A_1$  and  $A_2$  by Thin-Layer Chromatography.

(a) The concentrated solution of fraction  $A_1$  (Fig. 3) was spotted on a thin-layer plate ( $20 \times 20$  cm, 0.5 mm thick) prepared with cellulose (Merck, Cellulose microcrystalline) and developed by the ascending method with a solvent system of *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:5, v/v). After drying, the developed layer was divided horizontally into ten equal sections and scraped off. Each section was mixed with 2 g of cellulose powder (Toyo, Cellulose powder A). The antioxidative activity of this mixture was determined according to the procedure in Fig. 2.

(b) The constituents contained in Rf 0.1~0.2 zone of the above chroma-

togram were extracted with water, and the extract ( $A_2$ ) was concentrated and rechromatographed on cellulose plates by use of phenol-water (3:1, v/v) as a solvent system. The layer scraped in the manner mentioned in Fig. 6(a) was washed with ether ( $2 \times 7$  ml) in order to remove the phenol, and then the antioxidative activity was determined.

(c) Schematic diagrams showing the location of the ninhydrin-positive substances on the plate.

....., peroxide value of the control.

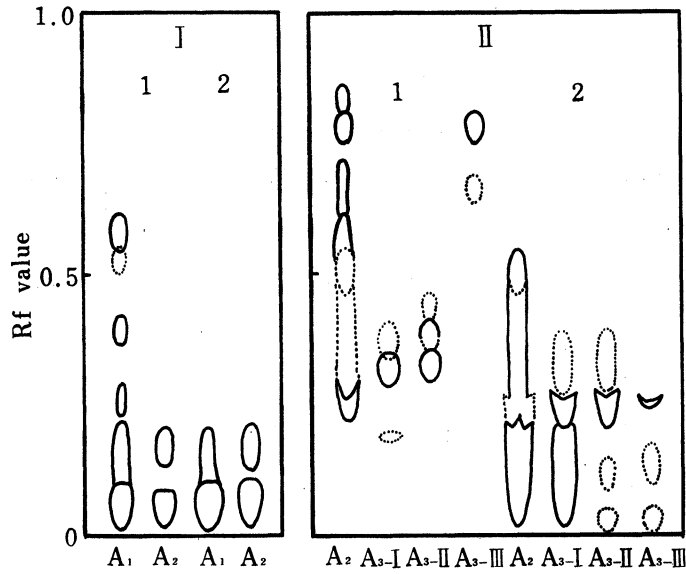


Fig. 7. Thin-Layer Chromatograms of Fractions  $A_1$ ,  $A_2$ , and  $A_3$ .  
 Solvent system: I, *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:5, v/v);  
 II, phenol-water (3:1, v/v).  
 Detection: 1, ninhydrin; 2, alkaline silver nitrate.  
 For other abbreviations, see Fig. 3 and Fig. 6.

**Table 1.** Amino Acids Contained in Fraction  $A_3$ .

Amino acid analysis was carried out with an automatic amino acid analyzer (JEOL, Type JLC-6AH).  
 For abbreviations, see Fig. 7.

| Amino acid              | Content (mol/100 mol) |           |            |
|-------------------------|-----------------------|-----------|------------|
|                         | $A_3$ -I              | $A_3$ -II | $A_3$ -III |
| Arginine                | 42                    | 6         |            |
| Serine                  | 21                    |           |            |
| Glycine                 | 17                    | 3         |            |
| Aspartic acid           | 10                    |           |            |
| Lysine                  | 6                     |           |            |
| Glutamic acid           | 4                     | 5         |            |
| Histidine               |                       | 1         |            |
| Unknown 1 <sup>a)</sup> |                       | 85        |            |
| Unknown 2 <sup>a)</sup> |                       |           | 75         |
| Unknown 3 <sup>a)</sup> |                       |           | 25         |

a) Unknowns were shown as leucine equivalent.

ニア性硝酸銀反応陽性の部分は  $A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3$  と分別が進むにつれて減少しているもので、抗酸化性に寄与している成分は  $A_3$ -I,  $A_3$ -II においてもニンヒドリン反応陽性物質であると推定される。そこで、調製的薄層クロマトグラフィーにより分取した  $A_3$ -I,  $A_3$ -II,  $A_3$ -III についてその含有アミノ酸を定量した。結果を Table 1 に示す。 $A_3$ -I からは6種のアミノ酸が検出されたが、アルギニンが

最も多く40%以上であった。A<sub>3</sub>-IIにはアルギニン、グルタミン酸、グリシンなどが少量含まれていたが、未知成分1が全体の85%を占め、これが主成分と考えられた。A<sub>3</sub>-IIIでは未知成分2が75%で主成分をなしている。アミノ酸の抗酸化性についてはこれまでに多くの報告がある。測定条件により異なるが、一般的に抗酸化力の強いものとしてはメチオニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンなどがあげられている<sup>3,4)</sup>。これからみるとA<sub>3</sub>-I画分は抗酸化力の特に強い既知アミノ酸を含んではいない。しかし、大豆油乳化液を基質として同じ方法で測定した19種のタンパク質構成アミノ酸はいずれも酸化抑制的で、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、ヒスチジンの抗酸化力は中程度であった。従って、これらのアミノ酸の合計が40%近くを占めるA<sub>3</sub>-I画分の抗酸化性は、上記アミノ酸の総合された効果によるものかも知れない。アルギニン、セリンは含量は多いが抗酸化力は弱いので、この画分の示す抗酸化性への寄与は小さいと考えられる。A<sub>3</sub>-II, A<sub>3</sub>-IIIについては、主要部分を占めている未知成分による可能性が大きい。しかし分画過程の各段階でみられるように、抗酸化性は化学的に類似のまたは異なった成分に広く分散しているので、分画しない透析外液の抗酸化性を、これら特定のアミノ酸またはアミノ化合物だけに帰すことは勿論できない。

## 要 約

おからの水抽出液を透析して得られた外液を各種のクロマトグラフィーを組合せて分画し、その画分の抗酸化性をリノール酸の含水エタノール溶液または大豆油乳化液を基質にして測定した。

抗酸化性成分はDEAE-セルロースにより3つのグループに分かれたが、その中では0.02Mのリン酸緩衝液(pH 7.0)の存在下でカラムに吸着されない成分が両基質に対して最も強い抗酸化性を示した。このものはセファデックスG-10では水で最初に溶出されてくる画分に存在した。セルロース薄層により、これはさらにニンヒドリン試薬やアンモニア性硝酸銀試薬で検出される多数のバンドに分かれたが、抗酸化性は主としてニンヒドリン反応陽性部分に認められた。抗酸化性を示すこれらの画分は、グリシン、アルギニン、グルタミン酸、セリン、アスパラギン酸、リジン、ヒスチジンと未知のニンヒドリン反応陽性物質を含むことが、アミノ酸分析により確かめられた。

終りに、実験に協力された祁答院宮子、市坪恵子の両嬢に感謝します。

## 文 献

- 1) 中村泰彦：鹿大教育学部研究紀要（自然科学篇）27, 19 (1976).
- 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：食品工誌, 18, 313 (1971).
- 4) 大村浩久, 尊田民喜, 浅田要一郎, 村中 誠, 橘 英文：食品工誌, 22, 395 (1975).

(1978年10月17日 受理)



### Summary

The outer solution obtained by dialyzing a water-extract from "Okara" was fractionated by a combination of several chromatographic procedures, and the antioxidative activity of the fractions was determined by use of an aqueous ethanol solution of linoleic acid or a emulsion of soybean oil as substrate.

The antioxidative constituents were separated into 3 groups on DEAE-cellulose. The group which was not adsorbed to the column in 0.02 M phosphate buffer of pH 7.0 was the most effective in inhibiting the oxidation of both substrates. This group was eluted foremost from a Sephadex G-10 column with water. This was further separated into many bands, which were visualized with ninhydrin reagent and/or alkaline silver nitrate reagent, by preparative thin-layer chromatography with cellulose. The antioxidative activity was detected mainly in the sections containing ninhydrin-positive bands. Amino acid analysis showed these ninhydrin-positive constituents were glycine, arginine, glutamic acid, serine, aspartic acid, lysine, histidine, and a few unknowns.