報 文

トコフェロールの酸化防止効果向上に関する研究
(第 12 報)

アミノ酸誘導体との相乗効果

青山 稔*・丸山武紀*・兼松 弘*・新谷 助*

塚本正人**・東海林 茂**・松本太郎***

* 財団法人日本食品油脂検査協会 (〒103 東京都中央区日本橋浜町 3-27-8)

** 月島食品工業株式会社 (〒134 東京都江戸川区東葛西 3-17-9)

*** 日本大学理工学部 (〒101 東京都千代田区神田駿河台 1-8)

Studies of the Improvement of Antioxidant Effect of Tocopherols. XII
Synergistic Effect on Amino Acid DerivativesMinoru AOYAMA*, Takenori MARUYAMA*, Hiromu KANEMATSU*,
Isao NIIBA*, Masato TSUKAMOTO**, Shigeru TOKAIRIN**,
and Taro MATSUMOTO**** Japan Institute of Oils & Fats, Other Foods Inspection, Foundation
(3-27-8, Nihonbashi-Hamacho, Chuo-ku, Tokyo)** Tsukishima Foods Industrial Company, Ltd.
(3-17-9, Higashikasai, Edogawa-ku, Tokyo)*** Faculty of Science and Technology, Nihon University
(1-8, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo)

The synergistic antioxidant effects of tocopherol (Toc) and 20 kinds of methyl esters of amino acids on lard and palm oil were investigated by the oven and AOM tests. The amino acid derivatives were used in consideration of the insolubility of their free forms in fats. They were homogeneously dissolved using monoglyceride as the medium, as previously described. The antioxidant effects of them were also studied in the same manner.

- 1) The solubility of the amino acid derivatives was found in most cases to be less than 40 ppm.
- 2) On lard, 14 amino acid derivatives had rather antioxidant effects according to the oven test, particularly so in the case of methyl L-tryptophan (L-Trp) and methyl lysine (Lys), but dimethyl L-glutamate (Glu-2) tended to accelerate oxidation. However, such effects were not observed by the AOM test. All the derivatives except Glu-2 enhanced the antioxidant effect of Toc according to the oven and AOM tests, and the addition of L-Trp, Lys, methyl proline (Pro) or methyl tyrosine (Tyr) along with the mixture of *d*-Toc (*m*-Toc) was particularly effective for this.
- 3) On palm oil, 9 of the amino acid derivatives had rather antioxidant effects by the oven test. Pro and L-Trp did so markedly, but Glu-2 and methyl serine tended to accelerate oxidation. With Toc, 12 derivatives showed synergistic effects and the addition of Pro, L-Trp, Try or dimethyl cystine along with *m*-Toc was particularly effective. Similar effects were observed by the AOM test.

1 結 言

油脂の酸化安定性に対するアミノ酸の効果については
それ自体酸化防止効果を示すもの及びトコフェロール
前報: 油化学, 35, 449 (1986)

(Toc) のような他の酸化防止剤との相乗効果を示すもの
があるなど、数多く報告されている^{1)~6)}。また、それら
の効果を示したアミノ酸の種類やその効果の程度が報告
によって異なるのは、主として油脂の種類、評価試験の
方法及び条件、並びに非水系、溶液系及び乳化型などの

実験系の相異による⁹⁾とされている。しかし、これまでの研究では油脂に不溶のアミノ酸を水またはアルコールに溶解して添加されているため油脂への均一な混和は望めず、この不均一性が異なる結果が得られた主因と考えられる。さらにアルカリ溶液で添加する例¹⁾もあり、たとえ優れた効果があっても実際に食用油脂へ適用することはできない。

一方、著者らはさきに難溶性のクエン酸⁷⁾や L-アスコルビン酸⁸⁾を乳化剤のモノグリセドに分散して油脂に添加することで均一に混和することに成功し、この手法を用いてそれらの有機酸の Toc との相乗性を明らかにした。また、湯木ら²⁾がメタノール溶液として油脂への添加を試みたエステル型のアミノ酸は少なくとも遊離型より油溶性が高いと思われるので、上述の手法を利用すれば油脂への均一な混和がある程度可能と考えられる。

以上の観点から、本報ではアミノ酸のメチルエステル 20 種をモノグリセドを媒体とする手法で油脂への均一な混和を試み、このようにして調製した基質油脂を用いて前報^{7)~9)}同様のオープン試験及び AOM 試験によりアミノ酸誘導体の Toc との相乗性並びに誘導体自体の酸化防止性について検討したので報告する。

2 実 験

2.1 試料及び試薬

基質の豚脂及びパーム油並びに天然濃縮 Toc(m-Toc) 及びモノグリセドはいずれも前報^{7),8)}と同じものを使用した。

アミノ酸誘導体は、グリシン (Gly), DL-トレオニン (DL-Thr), L-セリン (Ser), L-プロリン (Pro), L-アラニン (Ala), L-バリン (Val), L-メチオニン (Met), L-イソロイシン (Ile), L-ロイシン (Leu), L-チロシン (Tyr), L-フェニルアラニン (Phe), L-リシン (Lys), L-ヒスチジン (His), L-アルギニン (Arg), L- 及び DL-トリプトファン (L-Trp 及び DL-Trp) の各モノメチルエステル塩酸塩並びに DL-アスパラギン酸 (DL-Asp), L-グルタミン酸 (Glu-2) 及び L-シスチン (Cys) の各ジメチルエステル塩酸塩とグルタミン酸-γ-メチルエステル (Glu-1) の計 20 種 (以上 Sigma 社製) を使用した。なお Cys, Lys, His 及び Arg の二塩酸塩並びに 15 種の一塩酸塩は 95% メタノール溶液としてアンバーライト IRA 401 型 (OH 型) カラム (内径 2×16 cm) にのせて脱塩酸化して、同溶液による溶出液を減圧下に 60°C で濃縮して各メチルエステルを得た。

2.2 試料の調製

基質油脂の調製は、油脂に対し 1% に相当するモノグリセドにあらかじめ各アミノ酸メチルエステル (基質対比 100~200 ppm 相当量) を加えて混合したのち、m-Toc 添加油脂または無添加油脂を加えて、水浴上でか

くはんしながら均一に混和した。これを静置して不溶解部を沈降させ、その上澄み液を試料とした。なお、m-Toc 添加量は豚脂に 0.02%, パーム油に 0.05% とした。

2.3 方 法

試料の酸化安定性は前報^{7),8)}同様のあらかじめ 1 g ずつ小ビーカーにはかりとる方法の 60°C オープン試験による過酸化価 (POV)⁹⁾の経日変化及び AOM 試験⁹⁾で POV が 30 及び 100 に達する時間によって評価した。

基質油脂に溶解したアミノ酸メチルエステル量は、主として塩酸で加水分解したのち日立製 835 型高速アミノ酸分析計¹⁰⁾で測定した。ただし、Trp はアルカリ加水分解法¹¹⁾, Cys は過ギ酸酸化法¹¹⁾で分析した。なお上述の方法で調製した試料油脂中の各アミノ酸メチルエステル含量は Table-1 のとおりである。

3 結果及び考察

3.1 オープン試験によるアミノ酸誘導体の Toc との相乗性

3.1.1 豚脂 アミノ酸メチルエステルは Table-1 に示すように種類によって溶解量が異なるので、溶解量が 20 ppm 以下を 1 群, 20~40 ppm を 2 群, 40 ppm 以上を 3 群とし、これらを 0.02% の m-Toc 添加及び無添

Table-1 Solubilities of amino acid methyl esters to lard and palm oil, when added along with monoglyceride.

Concentration (ppm)	Amino acid methyl ester
~20	Ile, Met, Phe, DL-Trp, Val
20~40	Pro, Ser, His, L-Trp, Gly, DL-Thr, Cys, Glu-1, Ala, Leu, Arg
40~60	DL-Asp
60~80	Tyr, Lys
80~	Glu-2

Ile : L-Isoleucine methyl ester
 Met : L-Methionine methyl ester
 Phe : L-Phenylalanine methyl ester
 DL-Trp : DL-Tryptophan methyl ester
 Val : L-Valine methyl ester
 Pro : L-Proline methyl ester
 Ser : L-Serine methyl ester
 His : L-Histidine methyl ester
 L-Trp : L-Tryptophan methyl ester
 Gly : Glycine methyl ester
 DL-Thr : DL-Threonine methyl ester
 Cys : L-Cystine dimethyl ester
 Glu-1 : γ-Methyl L-glutamate
 Ala : L-Alanine methyl ester
 Leu : L-Leucine methyl ester
 Arg : L-Arginine methyl ester
 DL-Asp : Dimethyl-DL-aspartate
 Tyr : L-Tyrosine methyl ester
 Lys : L-Lysine methyl ester
 Glu-2 : Dimethyl-L-glutamate

加豚脂に加えた試料のオープン試験による POV の経日変化をそれぞれ **Table-2~4** に示す。Toc 無添加の場合、1 群では Val 及び Ile, 2 群では Gly, そして 3 群では Glu-2 を除く アミノ酸メチルエステルを混和した試料は、無添加試料より POV 上昇が明らかに抑制され、その効果は L-Trp 及び Lys で顕著であった。それぞれの溶解量が異なるため、アミノ酸誘導体間の酸化防止力を単純に比較できないが、最高の効果を示した L-Trp はその溶解量より大きい 3 群及び同じ溶解量範囲である 2 群の他のものより強い効力を有していた。一方、Glu-2 の場合はむしろ酸化促進効果を示したが、そのモノメ

Table-2 Effect of amino acid methyl esters in first group^{a)} on the oxidation of lard with and without the mixture of *d*-tocopherols by the oven test at 60°C.

Amino acid methyl ester	Mixture of <i>d</i> -tocopherols added (%)	POV		
		10 d	20 d	30 d
No addition	0	76	303	—
Val, Ile	0	70	310	—
Phe	0	52	251	—
DL-Trp, Met	0	39	205	—
No addition	0.02	13	40	92
Val, Ile	0.02	8	27	65
DL-Trp	0.02	5	19	55
Phe	0.02	1	13	37
Met	0.02	0	5	34

a) : Dissolved below 20 ppm.

For abbreviations, see **Table-1**.

Table-3 Effect of amino acid methyl esters in second group^{a)} on the oxidation of lard with and without the mixture of *d*-tocopherols by the oven test at 60°C.

Amino acid methyl ester	Mixture of <i>d</i> -tocopherols added (%)	POV		
		10 d	20 d	30 d
No addition	0	76	303	—
Gly	0	68	310	—
Ala, Ser, Leu	0	59	293	—
DL-Thr, Arg, Glu-1	0	49	280	—
His, Cys	0	40	218	—
Pro	0	36	172	—
L-Trp	0	4	77	340
No addition	0.02	13	40	92
His	0.02	10	33	77
Ala, Ser, Arg	0.02	9	26	64
DL-Thr, Gly	0.02	5	21	60
Leu, Cys, Glu-1	0.02	3	16	41
L-Trp, Pro	0.02	0	3	11

a) : Dissolved in 20~40 ppm.

For abbreviations, see **Table-1**.

Table-4 Effect of amino acid methyl esters in third group^{a)} on the oxidation of lard with and without the mixture of *d*-tocopherols by the oven test at 60°C.

Amino acid methyl ester	Mixture of <i>d</i> -tocopherols added (%)	POV		
		10 d	20 d	30 d
No addition	0	76	303	—
Glu-2	0	109	—	—
DL-Asp	0	47	274	—
Tyr	0	42	235	—
Lys	0	8	141	—
No addition	0.02	13	40	92
Glu-2	0.02	16	42	96
DL-Asp	0.02	2	14	39
Lys, Tyr	0.02	0	7	21

a) : Dissolved above 40 ppm.

For abbreviations, see **Table-1**.

チルエステルの Glu-1 は溶解量が少ないのに酸化防止効果及び Toc との相乗効果がみられたこと、そして Ahmad ら¹⁾ が遊離グルタミン酸の市販植物油に対する酸化防止効果を認めたことから、このアミノ酸では遊離のカルボキシル基が有効に作用しているのかも知れない。

Toc 添加の場合は、Glu-2を除くアミノ酸メチルエステルはいずれもその添加により m-Toc の酸化防止効果を向上させることを示した。なかでも Met, L-Trp, Pro, Lys 及び Tyr の m-Toc との併用は効果的であり、とくに L-Trp 及び Pro の場合は 30 d 後でも POV が約 10 しか上昇しなかった。アミノ酸の酸化防止効果はアミノ基の金属に対するキレート化能と過酸化物との反応による Toc の再生によるとされ⁵⁾、また湯木ら²⁾は Toc の OH 基の H と錯体を形成し、ペルオキシラジカルへの Toc の電子供与能を増大して相乗効果を示すと述べている。また、アミノ酸間の効果に相異があるのは油脂への親和性すなわち溶解性によるものとしているが³⁾、上述したようにその原因以外でも相異が認められた。m-Toc との併用効果が大きかったものに環状アミノ酸の L-Trp, Pro, Tyr, 含硫アミノ酸の Met 及び分子内に 2 個のアミノ基を有する Lys があり、これらのアミノ酸及びその誘導体の効果は Ahmad ら¹⁾、湯木ら²⁾ 及び渡辺ら⁴⁾ も認めていることから、これらの構造上の特徴もそれらの効果の一因であるように思われる。

3.1.2 パーム油 0.05% の m-Toc 添加及び無添加パーム油にアミノ酸メチルエステルを加えた試料のオープン試験による結果を 1~3 群の順にそれぞれ **Table-5~7** に示す。Toc 無添加の場合、1 群の DL-Trp, 2 群の Gly, Cys, Ala, L-Trp 及び Pro, 並びに 3 群の Tyr 及び Lys には酸化防止効果がみられ、その効果は Pro, L-Trp, Cys, Tyr 及び Lys の場合が大きかった。

Table-5 Effect of amino acid methyl esters in first group^{a)} on the oxidation of palm oil with and without the mixture of *d*-tocopherols by the oven test at 60°C.

Amino acid methyl ester	Mixture of <i>d</i> -tocopherols added (%)	POV		
		10 d	20 d	30 d
No addition	0	4	15	35
Met, Ile, Phe, Val	0	4	15	34
DL-Trp	0	2	12	28
No addition	0.05	6	18	37
Val, Ile	0.05	5	17	38
Met	0.05	4	10	28
Phe, DL-Trp	0.05	2	6	21

a) : Dissolved below 20 ppm.

For abbreviations, see **Table-1**.**Table-6** Effect of amino acid methyl esters in second group^{a)} on the oxidation of palm oil with and without the mixture of *d*-tocopherols by the oven test at 60°C.

Amino acid methyl ester	Mixture of <i>d</i> -tocopherols added (%)	POV		
		10 d	20 d	30 d
No addition	0	4	15	35
Ser	0	7	20	43
His, DL-Thr, Glu-1, Leu, Arg	0	6	16	37
Gly, Cys, Ala	0	2	7	24
L-Trp	0	1	5	20
Pro	0	0	1	14
No addition	0.05	6	18	37
His, Ser, DL-Thr	0.05	5	16	36
Arg, Ala, Leu	0.05	3	12	30
Gly	0.05	0	8	24
L-Trp, Cys	0.05	0	2	13
Pro	0.05	0	1	10

a) : Dissolved in 20~40 ppm.

For abbreviations, see **Table-1**.

一方、2 群の Ser 及び 3 群の Glu-2 はむしろ酸化促進効果がみられ、とくに Glu-2 が顕著であった。

m-Toc 添加の場合は、1 群の Val, Ile, 2 群の His, Ser, DL-Thr, 3 群の Glu-2, DL-Asp 以外のアミノ酸メチルエステルとの混和により POV 上昇の抑制効果がみられ、とくに Pro, L-Trp, Cys, Lys 及び Tyr の場合は効果的であった。しかし、Gly の場合はそれ単独の効果とほとんど差がみられなかった。一方、Glu-2 の場合はむしろ酸化促進的に作用したが、Ser の場合は単独使用で認められた酸化促進性がほとんどみられなくなった。

以上の結果、本報で使用したアミノ酸誘導体のうち m-Toc との併用効果がみられたのは豚脂では Glu-2 を除く 19 種に対し、パーム油では 12 種であり、その効

Table-7 Effect of amino acid methyl esters in third group^{a)} on the oxidation of palm oil with and without the mixture of *d*-tocopherols by the oven test at 60°C.

Amino acid methyl ester	Mixture of <i>d</i> -tocopherols added (%)	POV		
		10 d	20 d	30 d
No addition	0	4	15	35
Glu-2	0	15	28	52
DL-Asp	0	5	15	36
Tyr, Lys	0	1	6	26
No addition	0.05	6	18	37
Glu-2	0.05	13	25	48
DL-Asp	0.05	4	14	35
Lys	0.05	0	5	18
Tyr	0.05	0	2	12

a) : Dissolved above 40 ppm.

For abbreviations, see **Table-1**.**Table-8** Effect of amino acid methyl esters on the oxidation of lard with and without the mixture of *d*-tocopherols by the AOM test.

Amino acid methyl ester	Mixture of <i>d</i> -tocopherols added (%)	Hours to reach each POV	
		30	100
No addition	0	5	6
Glu-2	0	4	5
His	0	5	6
L-Trp, Tyr, Met, Gly	0	6	7
No addition	0.02	27	39
Glu-2	0.02	26	40
His, Gly	0.02	28	43
Met, Tyr	0.02	44	60
L-Trp	0.02	47	63

For abbreviations, see **Table-1**.

果も両油脂間に差があったのは基質の相異によるものであろう。しかし、非常に効果的であったものは豚脂の場合の Met とパーム油の場合の Cys 以外は両油脂に共通していた。従って、これらの構造上の特徴が Toc との相乗効果にもっとも寄与しているように思われる。

3-2 AOM 試験によるアミノ酸誘導体の Toc との相乗性

オープン試験の結果からアミノ酸メチルエステルの豚脂に対する酸化防止効果及び Toc との併用効果の程度に応じて L-Trp, Try, Met, Gly 及び Glu-2 を選び、これらを 0.02% の m-Toc 添加及び無添加豚脂に加えた試料の AOM 試験による結果を **Table-8** に示す。Toc 無添加の場合、オープン試験でもっとも効果を示した L-Trp を無添加豚脂に加えてもその POV が 30 及び 100 に達する時間をほとんど延長することはできなかった。湯木ら²⁾も AOM 試験でアミノ酸及びその誘導体

すべての酸化防止効果がないことを認めており、アミノ酸メチルエステルは AOM 条件で豚脂から急速に生成する過酸化物によって速やかに酸化分解するため、その酸化防止効果がほとんど現れなかったと推察される。また、オープン試験では酸化促進効果を示した Glu-2 でも AOM 試験ではその逆効果がみられなかったことから、Glu-2 も上述のように速やかに酸化分解したためその逆効果が現れなかったと思われる。

m-Toc 添加の場合は、Glu-2, His 及び Gly は m-Toc 単独添加試料の POV 上昇傾向とほとんど差がみられなかったが、その他は明らかに m-Toc の酸化防止効果を向上させ、m-Toc との相乗効果があることを示した。しかもそれらのうち L-Trp の効果がもっとも大きく、オープン試験と同様であった。これは、併用した m-Toc の酸化防止効果によりアミノ酸メチルエステルはその分解が抑制されたためと考えられる。なお、Glu-2 の場合はオープン試験では明らかに m-Toc の酸化防止効果を減少させたが、AOM 試験では m-Toc 単独の場合とほとんど差がなかったのは AOM 温度で不安定なのかもしれない。

パーム油の場合も、オープン試験で得られた酸化防止効果及び Toc との併用効果の程度に従って選び出した L-Trp, Tyr, Leu, DL-Asp 及び Glu-2 をそれぞれ 0.05% の m-Toc 添加及び無添加パーム油に加えた試料の AOM 試験による結果を Table-9 に示す。Toc

無添加の場合は、Glu-2, DL-Asp, Leu はほとんど酸化防止効果を示さなかったが、L-Trp 及び Tyr は明らかな効果を示した。これに対し m-Toc 添加の場合は、Glu-2 は m-Toc と併用してもあまり変化がみられなかったが、その他はいずれも m-Toc との併用効果がみられ、とくに L-Trp はもっとも効果的であった。それ自体酸化安定性のよいパーム油は AOM 条件でも豚脂のように過酸化物の急速な生成はないのでアミノ酸メチルエステルの速やかな酸化分解も起こらない。従ってオープン試験で酸化防止効果を示したものは AOM 試験でも同様の効果を示したと思われる。しかし Glu-2 の場合はオープン試験と異なり Toc 添加及び無添加パーム油に加えてもほとんど変化がみられなかったことから、前述のように AOM 温度の油脂中では酸素と直接反応するかまたは熱分解されるように思われる。

以上の結果から、アミノ酸誘導体は油脂への均一な混和さえ解決すれば油脂酸化防止剤としての Toc の効果向上には有効な手段と考えられる。遊離のアミノ酸は油脂には不溶であるが乳化型油脂食品であるマーガリンでは水相に溶解して油脂との接触性を図ればその効果が期待されるので、前報¹¹⁾と同様にマーガリンを基質とする実験でその効果を検討中である。

終わりに分析に協力を得た(財)日本食品油脂検査協会館野朱美君に深謝する。なお、本報の要旨は第 25 回油化学研究発表会(昭和 61 年 11 月 5 日、豊中市)で講演した。

(昭和 62 年 5 月 20 日受理)

文 献

- 1) M.M. Ahmad, S. Al-Hakim, A.A.Y. Shahata, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 837 (1983)
- 2) 湯木悦二, 石川行弘, 吉和哲朗, 油化学, **23**, 497(1974)
- 3) T. Risom, R.J. Sims, J.A. Fioriti, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **57**, 354 (1980)
- 4) 渡辺幸雄, 綾野雄幸, 栄養と食糧, **25**, 621 (1972)
- 5) 益山新六, 油化学, **14**, 692 (1965)
- 6) 梶本五郎, “抗酸化剤の理論と実際”, 三秀書房 (1984), p. 55
- 7) 兼松 弘, 青山 稔, 丸山武紀, 新谷 勲, 塚本正人, 東海林 茂, 松本太郎, 油化学, **32**, 695 (1984)
- 8) 兼松 弘, 青山 稔, 丸山武紀, 新谷 勲, 塚本正人, 東海林 茂, 松本太郎, 油化学, **33**, 361 (1984)
- 9) 日本油化学協会編, “基準油脂分析試験法”, 2.4.12-71; 2.4.28.1-81
- 10) 日本食品工業学会 食品分析法編集委員会編, “食品分析法”, 光琳 (1982), p. 497
- 11) 青山 稔, 丸山武紀, 兼松 弘, 新谷 勲, 塚本正人, 東海林 茂, 松本太郎, 油化学, **35**, 449 (1986)

Table-9 Effect of amino acid methyl esters on the oxidation of palm oil with and without the mixture of *d*-tocopherols by the AOM test.

Amino acid methyl ester	Mixture of <i>d</i> -tocopherols added (%)	Hours to reach each POV	
		30	100
No addition	0	44	72
Glu-2	0	40	71
DL-Asp, Leu	0	44	77
Tyr	0	58	90
L-Trp	0	70	108
No addition	0.05	43	84
Glu-2	0.05	43	78
DL-Asp	0.05	56	89
Tyr, Leu	0.05	68	107
L-Trp	0.05	72	116

For abbreviations, see Table-1.