プロテアーゼ作用下でのオボアルブミン-グルコース系 褐変反応物の抗酸化性とトコフェロールとの相乗性

宇都宮 信子*, 早瀬 文孝**, 加藤 博通**

* 共立女子大学家政学部食物学科

** 東京大学農学部農芸化学科

Antioxidative Activities of Maillard Reaction Products of D-Glucose with Ovalbumin Hydrolyzed by Proteases, and Their Synergistic Effect with Tocopherols

Nobuko UTSUNOMIYA,* Fumitaka HAYASE,** Hiromichi KATO**

* Department of Food Science, Kyoritsu Women's University, Chiyoda-ku, Tokyo, 101

** Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo,
Bunkyo-ku, Tokyo, 113

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 36, 461~465 (1983)

In order to examine the antioxidative activities of protease-hydrolyzates of Maillard reaction products of proteins with sugars, we compared the antioxidative activity of ovalbumin-glucose browning products (OVGI) hydrolyzed by papain with that of ovalbumin hydrolyzed by papain (OVI).

We also examined the antioxidative activities of the browning products of ovalbumin hydrolyzates by proteolytic enzymes, with glucose (OVGI) and without glucose (OVI).

The antioxidative activity test was done by the measurement of the peroxide value of samples which were added into linoleic acid solution dissolved with 40% ethanol and incubated at 45°C.

The results obtained were as follows:

1) Each sample indicated some antioxidative activity, especially OVI obtained by hydrolysis with pronase showed more potent antioxidative activity than OVI and OVGI obtained by hydrolysis with papain.

2) Each sample indicated strong synergistic antioxidative effects with tocopherols.

3) Increment effect for the antioxidative activity of OVGI obtained by browning reaction with glucose was weak but that effect was clearly observed in the case of the browning reaction systems (OVGI) after the pronase-treatment.

(Received May 10, 1983)

食品中の成分で油脂の酸化防止に有効であるといわれているもののなかに含窒素系抗酸化性物質がある。これにはアミノ酸、ペプチド、タンパク質およびアミノ酸と還元糖による褐変反応生成物などが含まれる。

アミノ酸やペプチドの抗酸化性については多くの報告がなされており¹⁾⁻⁶⁾、また、アミノ酸と糖との褐変反応生成物では、キシロースとグリシン⁷⁾、ロイシン⁸⁾、またはヒスチジン⁹⁾とグルコース、およびロイシン、バリン等の分岐鎖アミノ酸と糖との混合物¹⁰⁾に抗酸化性が認められている。

一方、ジペプチドと糖との反応物では、N末端に分岐鎖アミノ酸を含むジペプチドと糖との褐変反応物¹¹⁾やヒスチジルグリニンとキシロースの反応物¹²⁾に抗酸化力が強いことが報告されている。しかし、タンパク質の酵素水解物と糖との褐変反応物については Lingnert ら¹²⁾の植物性タンパク質酵素水解物とグルコースによる褐変反応物の抗酸化性に関する報告にとどまり、詳細な知見は得られていない。そこで本研究では、タンパク質の酵素水解物と糖との褐変反応生成物の抗酸化性を検討する目的で、プロテアーゼ作用下で、オボアルブミン-グルコース系の褐変反応生成物を調製し、その抗酸化性とトコフェロールとの相乗性について検討した。

*〒101 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1

**〒113 東京都文京区弥生 1-1-1

実験方法

1. 試料

1) 実験材料 オボアルブミンは新鮮鶏卵(産卵後24時間以内)60個, 3.4 kgを用い, 既報¹³⁾により調製した。2回再結晶後凍結乾燥品として65 gの収量であった。SDS-ポリアクリルアミドゲル(7.5%)電気泳動法により単一バンドであることを確認した。

2) 酵素 タンパク質分解酵素はパペイン(EC:3.4.22.2, メルク製), プロナーゼ P(科研化学製)の2種類を用いた。

3) 試薬 リノール酸は和光純薬(純度98%, 抗酸化剤無添加), トコフェロールはエーザイ製(*d*-Mixed Tocopherols conc.)の純度80%(組成 $\alpha=10.3\%$, $\gamma=54.9\%$, $\delta=34.8\%$), D-グルコースは関東化学製の試薬(特級), ジブチルヒドロキシルエーテル(BHT)は和光純薬の製品を用いた。

2. 抗酸化性試験用試料の調製

実験には Fig.1 に示す二つの褐変反応系試料を用いた。I系としては, オボアルブミンとグルコースを2), 3)の条件にて褐変反応させた後, 1)の条件下で酵素水解し, 凍結乾燥したもの(OVG_I), II系としてはオボアルブミンを1)の条件下にて酵素水解し, 凍結乾燥させた後にグルコースを加えて2), 3)の条件下にて褐変反応を行なったもの(OVG_{II}), また対照としては, 二つの系のそれぞれグルコース無添加群(OV_I, OV_{II})を用いた。

1) 酵素水解条件 オボアルブミンまたはその褐変反応物10 gを脱イオン水500 mlの割合に懸濁し, 沸騰水中で15分間加熱変性後, 放冷し, 酵素400 mgを添加した。なお, 本液のpHはそれぞれの酵素の至適pHに調整し, 37°Cに保ち, 所定時間加水分解を行なった。反応停止は100°Cに5分間保った。

2) オボアルブミンおよびオボアルブミン酵素水解物の褐変反应用試料の調製 オボアルブミンまたはオボアルブミン酵素水解物の溶液に0.5 M炭酸水素ナトリウム液を加えて, pH 7.0に調整し, この溶液を二分して, その一方に試料重量の10%のD-グルコースを加え, 両液をそれぞれ凍結乾燥して粉末とした。

3) 褐変反応条件 粉末試料を秤量ビン(40×40 mm)に一定量採取し, 相対湿度(RH)75%のデシケーターに入れ, 50°Cに保存し, 所定時間反応させた。

3. 測定方法

1) 加水分解率の測定 アミノ態窒素および全窒素を常法¹⁴⁾により測定し, 全窒素に対するアミノ態窒素の割合で示した。

2) 着色度の測定 未褐変および褐変反応物1 gを95 mlの脱イオン水に懸濁し, イソプロピルアルコール5 mlとプロナーゼ5 mgを加えて, pH 8.0に保ち, 37°C, 48時間反応後, 1%水溶液とし, 420 nmの吸光度を測定した。

3) 抗酸性の測定 抗酸化力は含窒素系抗酸化性物質では窒素含有量が多くなるに従って増強される¹⁵⁾といわれているところから, いずれの抗酸化性試験においても添加試料は全窒素量換算で1.2 mgと一定量とした。抗酸化性の測定は桐ヶ谷らの方法⁷⁾¹⁶⁾に従った。すなわち100 ml 共栓三角フラスコにリノール酸1 gを取り, 20 ml エチルアルコールに溶解させ, さらに0.2 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)25 mlと試料液5 mlを加え, よく攪拌した後, 密栓して, 45°Cの恒温器に所定時間保存し, 酸化させた。この混液を分液ロートに移し, クロロホルムで抽出後, 過酸化水素価(POV)を測定した¹⁷⁾。抗酸化力はコントロールのPOV値を100とし, 褐変反応調製物を添加したもののPOV値との比をPOV%として表示した。

実験結果および考察

1. 褐変反応I系調製物の抗酸化性

オボアルブミンにD-グルコースを加え, 褐変反応後にパペインで水解して得た褐変反応I調製物の抗酸化性について調べた。

Table 1はOVG_IおよびOV_Iの貯蔵時間に対する着色度, 水解率および抗酸化力を示す。OVG_Iは50°C, 75% RHの貯蔵条件では反応初期の段階より急激に着色した。これに対し対照としたOV_Iは同条件に放置しても着色度の増大は認められなかった。またパペインによる水解率は, 褐変反応条件下では貯蔵日数が長いほど低下した。この原因は, 褐変反応により水不溶部分が増加し, 酵素作用を受けにくくなるためと考えられる。OVG_Iの水解率がOV_Iより高いことは, グルコースと

Fig.1. Preparative procedure samples.

Table 1. Antioxidative activities of OVG_I, OV_I and ovalbumin.^{a)}

Samples	Stored time ^{b)} (days)	O.D. (420 nm)	Hydrolyzing ratio ^{c)} (%)	POV ratio ^{d)} (%)
OVG _I	0	0.05	23	68
	3	0.14	20	53
	6	0.38	16	55
	20	0.61	14	67
OV _I	0	0.05	18	60
	3	0.08	16	62
	6	0.08	13	63
Ovalbumin	—	—	—	100

^{a)} Each sample (1.2 mg as nitrogen) was incubated with linoleic acid (1.0 g) in *ca.* 40% ethanol at pH 7.0 and 45°C for 48 hr.

^{b)} Stored at 50°C and 75% RH.

^{c)} Incubated by papain at pH 5.0, 37°C for 48 hr.

$$\text{Hydrolyzing ratio (\%)} = \frac{\text{Amino N}}{\text{Total N}} \times 100$$

^{d)} POV ratio (%) was calculated as the percentage of POV (sample) per POV (control).

の反応の結果、水に対する溶解性が増加する¹⁸⁾ためと考えられる。

一般に、アミノ酸と糖との褐変反応物では、褐変に伴う着色度が高くなるに従って、抗酸化性は上昇する¹⁶⁾といわれている。しかし、Table 1 にみられるように OVG_I および OV_I の抗酸化力は弱く、また、貯蔵時間による抗酸化力の増大は認められなかった。これはパパインの基質特異性と褐変反応によるペプチドの立体構造の変化などが原因であろうと推察される。なお、未水解のオボアルブミンには抗酸化性は認められなかった。

タンパク質酵素水解物のトコフェロールやフェノール系抗酸化剤に対するシネルギストの効果について、多くの報告^{6)19)~21)}がなされている。

そこで Table 2 に示したように OVG_I、または OV_I とトコフェロールとの相乗作用について調べた。OVG_I、OV_I とともに 50°C、75% RH の条件下に貯蔵 6 日目の調製物を抗酸化性試験の試料とした。Table 1 と同様に、OVG_I、OV_I とともに単独では抗酸化力は弱い。しかし、トコフェロールが共存すると、トコフェロール単独の添加時よりも顕著に POV% の低下がみられ、比較として用いた BHT とほぼ同等の強い抗酸化力を示した。このことから、これら褐変反応 I 系調製物 OVG_I、OV_I とともに抗酸化性は単独使用時では、比較的弱い、シネルギストとしての働きが大きく、トコフェロールとの共存においては顕著に抗酸化力が増強した。

2. 褐変反応 II 系調製物の抗酸化性

つぎにオボアルブミンを酵素 (パパイ、またはプロ

Table 2. Antioxidative activities of OVG_I and OV_I hydrolyzed by papain,^{a)} and its synergistic effects with tocopherols.

	POV ratio ^{b)} (%)
OVG _I	48
OV _I	56
Tocopherols (100 µg)	25
OVG _I +tocopherols (100 µg)	7
OV _I +tocopherols (100 µg)	8
BHT (0.4 mg)	6
Control	100

^{a)} OVG_I and OV_I were prepared by storing at 50°C and 75% RH for 6 days, and then by hydrolyzing (hydrolyzing ratio: 16%) at pH 5.0 and 37°C for 48 hr.

^{b)} The same as d) in Table 1.

ナーゼ P) で水解し、この水解物にグルコースを添加し凍結乾燥して得られる粉末を 50°C、75% RH の条件下で所定時間貯蔵した褐変反応 II 系調製物 (OVG_{II}, グルコース無添加のものを OV_{II}) について検討した。

Table 3 に種々の条件により調製した褐変反応 II 系調製物の抗酸化性を示した。パパイ、を用いた場合の OVG_{II} (以下パパイ処理 OVG_{II} と称す) の抗酸化力は褐変反応 I 系調製物の OVG_I とほぼ同程度であった (Table 1, 2)。

Table 3. Antioxidative activities (POV ratio %) of OVG_{II} and OV_{II} hydrolyzed by papain* or pronase.*

Stored time** (hr)	OVG _{II} papain	OV _{II} papain	OVG _{II} pronase	OV _{II} pronase
0	68	60	59	56
7	55	—	32	47
24	—	—	43	55
48	60	80	35	63
53	53	81	—	—
72	—	—	45	62
120	47	74	—	—
140	—	—	30	70
380	—	—	40	—

* Incubated with papain at pH 5.0 and 37°C for 48 hr, or with pronase at pH 8.0 and 37°C for 48 hr.

Hydrolyzing ratio by papain : 18%.

Hydrolyzing ratio by pronase : 37%.

** Stored at 50°C and 75% RH.

Fig. 2. Antioxidative activities of OVG_{II}* and OV_{II}* hydrolyzed by pronase, and its synergistic effects with tocopherols.

(1) Control, (2) OV_{II}, (3) OVG_{II}, (4) Tocopherols (100 µg), (5) OV_{II}+tocopherols (100 µg), (6) OVG_{II}+tocopherols (100 µg).

* OVG_{II} and OV_{II} were prepared by hydrolyzing at pH 8.0 and 37°C for 48 hr (hydrolyzing ratio: 37%), and then by storing at 50°C and 75%RH for 140 hr.

一方、プロナーゼを用いた場合（以下プロナーゼ処理 OVG_{II} と称す）の抗酸化力は貯蔵 7 時間後に増強されたが、それ以後の貯蔵では変化が認められなかった。プロナーゼ処理 OVG_{II} とパパイニン処理 OVG_{II} の抗酸化力の差異は、両者の水解率の差、すなわちペプチドの平均分子量の違いによると考えられる。プロナーゼ処理の場合、水解率は 37% であり、水解物の平均分子量はトリペプチド程度のオリゴペプチドに該当する。また、水解の際に生じるペプチドの N 末端アミノ酸の種類によっても抗酸化能に影響を与えることも考えられる¹¹⁾¹²⁾。

Fig. 2 はプロナーゼ処理 OVG_{II} およびプロナーゼ処

理 OV_{II} を 50°C, 75% RH の条件下で、140 時間貯蔵した試料を単独あるいはトコフェロールを添加して、45°C, 30 日間インキュベートした場合の POV 値の変化を示す。OVG_{II}, OV_{II} とともにトコフェロールとの相乗作用が顕著であった。また、トコフェロール添加時の OVG_{II} と OV_{II} の抗酸化力はインキュベーション 30 日間までは大きな差異は認められなかった。

山口ら²³⁾は、大豆タンパク質の酵素水解物中の抗酸化力の強いペプチドの分子量は 2,500~3,000 の画分であり、トコフェロールとの相乗作用をもつ画分はこれよりも小さい分子量のペプチドであると報告している。褐変反応 I 系および II 系調製物の抗酸化力は弱い、両者ともトコフェロールとの相乗作用が顕著に認められることから、オボアルブミンの水解率の差がトコフェロールとの相乗性に与える影響は少ないと考えられる。

なお、II 系調製物の場合は、パパイニン処理、プロナーゼ処理ともに、グルコースと反応させた OVG_{II} のほうが OV_{II} よりも抗酸化性が強いことが明らかに認められ (Table 3)、褐変反応は抗酸化性の増強に有効であると考えられる。

要 約

タンパク質と糖による褐変反応生成物の抗酸化性におよぼすプロテアーゼ処理の効果を検討するため、オボアルブミン-グルコース系の褐変反応生成物にパパイニンを作用させ (OVG_I)、グルコースと反応させない対照区 (OV_I) とその抗酸化性を比較した。また、オボアルブミンを、まずプロテアーゼ処理したのちグルコースと反応させた調製物 (OVG_{II}) とグルコースと反応させない対照区 (OV_{II}) についても検討した。抗酸化性の評価は

リノール酸の含水エタノール溶液に試料を添加し、過酸化価を測定した。

1) いずれの調製物も抗酸化力を示したが、とくに水解にプロナーゼを用いた OVG_{II} は同処理 OV_{II} やパバイン処理 OVG_{II} よりも強い抗酸化力を示した。

2) トコフェロールとの相乗性を検討した結果、いずれの調製物も強い相乗効果を示した。

3) グルコースとの褐変反応による抗酸化性の増強効果は、OVG_I では弱かったが、プロテアーゼ処理してから褐変させた系 (OVG_{II}) では明らかに認められた。

文 献

- 1) 千畑一郎: *New Food Ind.*, 11(8), 10 (1969)
- 2) 山口直彦: *日食工誌*, 18, 313 (1971)
- 3) 山口直彦, 横尾良夫, 藤巻正生: *日食工誌*, 22, 425 (1975)
- 4) Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M. and Chibata, I.: *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 1912 (1979)
- 5) Bichov, S.J., Masuoka, Y. and Henick, A.S.: *Food Technol.*, 21, 466 (1967)
- 6) 山口直彦, 横尾良夫, 藤巻正生: *日食工誌*, 26, 65 (1979)
- 7) Kirigaya, N., Kato, H., Fujimaki, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 32, 2287 (1968)
- 8) 加藤博通, 堀江敏子, 藤巻正生: *栄養と食糧*, 29,

179 (1976)

- 9) Lingnert, H. and Eriksson, C.E.: *J. Food Process. Preserv.*, 4, 161 (1980)
- 10) Kawashima, K., Itoh, H. and Chibata, I.: *J. Agric. Food Chem.*, 25, 202 (1977)
- 11) Kawashima, K., Itoh, H. and Chibata, I.: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 987 (1981)
- 12) Lingnert, H. and Eriksson, C.E.: *J. Food Process. Preserv.*, 4, 173 (1980)
- 13) Kekwick, R.A. and Cannan, R.K.: *Biochem. J.*, 30, 227, 235 (1936)
- 14) 東京大学農学部農芸化学教室編: 実験農芸化学, 上巻, 106, 109 (1978), 朝倉書店 (東京)
- 15) 桐ヶ谷紀昌, 加藤博通, 藤巻正生: *農化*, 43, 484 (1969)
- 16) 加藤博通, 石川久隆, 榎尾 一, 土田広信, 藤巻正生: *農化*, 49, 173 (1975)
- 17) 日本油化学協会編: 基準油脂分析試験法, 2, 4, 12-71 (1971)
- 18) Watanabe, K., Sato, Y. and Kato, Y.: *J. Food Process. Preserv.*, 3, 263 (1980)
- 19) Bichov, S.J. and Henick, A.S.: *J. Food Sci.*, 37, 873 (1972)
- 20) Kawashima, K., Itoh, H. and Chibata, I.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 827 (1979)
- 21) 岡本已恵子, 本間清一, 藤巻正生: *家政誌*, 33, 585 (1982)
- 22) 山口直彦, 横尾良夫, 藤巻正生: *日食工誌*, 22, 431 (1975)

(昭和58年5月10日受理)