醤油成分による油脂可溶化現象

(第3報) 可溶化系におけるアミノ酸およびペプチドの挙動

小野 文夫*・青山 康雄*

Solubilization Phenomenon of Fats and Oils by Solid Components of Soy Sauce

Part III. Effects of amino acids and some peptides in the solubilized system

FUMIO ONO* and YASUO AOYAMA*

Oil solubilizing components in the nitrogenous fraction of soy sauce were investigated by adding amino acid and some peptide preparations in the standard system consisting of soy sauce powder, cottonseed oil and water.

Hardness and adhesiveness of the solubilized system were apparently promoted by amino acids possessing alkyl radicals such as Ileu, Met, Leu, Val and some peptides such as Gly-Glu and Glu-Asp.

These amino acids at 1% or higher concentration lowered the surface tension of water, which paralleled with promotion of the solubilization phenomenon in the standard system. On the other hand, 0.03% surfactants did not promote solubilization, although they reduced effectively the surface tension of water.

These results suggested that solubilization of oil in the aqueous system containing about 70% soy sauce powder is caused by the amino acids and the peptides in the powder acting as micelles with non-nitrogenous components of soy sauce.

(Received May 14, 1976)

醤油エキスを特定高濃度に含有する水相の示す油脂可溶化現象¹⁾は醤油中のアミノ酸およびペプチドを可溶化活性区分としてなることを前報²⁾において明らかにした。そしてこれらの窒素成分がそれを含有する水相条件下で、界面活性的に挙動することに基いてなるものと推定した。

タンパク質とその分解物が界面活性を有することは知られており、その界面活性を利用する新タンパク食品の開発の試みは今まで数多くなされている。最近では青木ら³⁻⁵⁾は大豆タンパク質とその分解物、ならびに微生物タンパク質について、乳化能の面から食品素材としての加工適性を検討している。また柴崎ら⁶⁾は豆乳について、遠藤ら⁷⁾は卵黄タンパクについて、また伊藤ら⁸⁾は牛乳タンパクについてそれぞれタンパク質と脂肪との相互作用

を検討している。しかし、いずれも乳化現象面からのアプローチであり、タンパク質およびその分解物の挙動を可溶化現象との関連において検討した報告は見当らない。

著者らは醤油エキス成分の示す油脂可溶化現象の発現に関与する成分の検索を前報に引き続いて試み、アミノ酸およびペプチド製剤を粉末醤油、綿実油および水からなる標準構成系に添加する方法でそれらの可溶化活性を検討し、またあわせて界面活性との関係について若干考察したのでそれらの結果を報告する。

実験方法

1. 可溶化試料の調製

先の結果¹⁾に基いて油脂可溶化現象を示す条件とし

* キッコーマン醤油株式会社中央研究所 (千葉県野田市野田 399)

Central Research Laboratories, Kikkoman Shoyu Co., Ltd. 399 Noda, Noda-shi, Chiba-ken

て、粉末醤油 25 g, 綿実油 25 ml および蒸留水 10 ml からなる系を標準構成として用い、前二者をあらかじめ混和した後、これに蒸留水または供試アミノ酸およびペプチドの水溶液を加え、Kenwood ミキサーにより、室温下で、120 rpm, 10 分攪拌混和した。

2. 供試アミノ酸、ペプチドおよび界面活性剤

いずれも市販製剤を用い、アミノ酸は日本理化学薬品(株)製、ペプチドは東京化成工業(株)および蛋白質研究奨励会製、また界面活性剤は東京化成工業(株)製を供試した。アミノ酸およびペプチドは水溶液として標準構成中蒸留水と置換し、また界面活性剤はそのエタノール溶液を粉末醤油に加え混和のちエタノールを除去して用いた。

3. 可溶化物の性状測定

前報の方法¹⁾と同様にして、Rheo Meter R-UDIV (富士理科学工業製)により、試料に対してプランジャーを圧着および引離す際の応力変化を求め、その正負の最大値を硬さ $F(c)$ および付着性 $F(a)$ として求めた。また本試料の 2% (w/v) 水溶液 (乳化型に転換) について、綿実油の微滴分散にもとづく濁度 $\log I_0/I$ (I_0 は入射光の強度, I は試料液を通して光の強度) を求めた。

4. 可溶化油量限界の測定

標準構成条件で得られた可溶化試料を引き続き攪拌しながら、これにさらに綿実油を滴下し、 $F(c)$ 変化を求め、その値の最大となるときの系に含まれた総綿実油量として表わした。

5. 表面張力測定

du Noüy 輪環法⁹⁾により室温 (20°C) 下で測定した。装置は表面及界面張力試験器 (島津製作所製) を用いた。

実験結果および考察

1. アミノ酸の可溶化に及ぼす影響

前報¹⁾で明らかにしたように標準構成系はそれ自体、綿実油を透明様に包容し可溶化物をなすが、この系にさらに各種のアミノ酸をあらかじめ区々の濃度で含有させて、同様に可溶化処理し、生成物の性状に及ぼすアミノ酸の添加の影響を検討した。

Fig. 1 に Isoleucine (Ileu) を添加したときのレオメーターチャートを表例として示した。このようにある種のアミノ酸は波高を著しく変化させ、生成物の性状に影響することが認められた。

こうして得たチャート上の正負の波高をそれぞれ試料の硬さ $F(c)$ および付着性 $F(a)$ とし、アミノ酸の種類、

Fig. 1. Effect of isoleucine on the hardness and the adhesiveness of the solubilized system obtained by Rheo Meter measurement

Isoleucine was added in the standard system as follows, (a): control (none), (b): 40 mg, (c): 80 mg, (d): 120 mg, (e): 160 mg, (f): 200 mg

Fig. 2. Effects of amino acids on the hardness, $F(c)$ of the standard solubilized system

a: Ileu., b: Met., c: Leu., d: Val., e: His., f: Thr., g: Ala., h: Ser., i: Glu., j: Lys., k: Gly., l: Asp., m: Pro., n: Phe.

添加量との関係を求め、Fig. 2 を得た。なお $F(a)$ の変化は $F(c)$ のそれと全く同傾向であったため図を省略した。本図から明らかなように Isoleucine (Ileu), Methionine (Met) および Leucine (Leu) は添加量に応じて著しく $F(c)$ を高め、また Valine (Val), Histidine (His) および Alanine (Ala) も若干の増強効果を示した。Serine (Ser), Sodium glutamate (Na-Glu),

Table 1. Effects of amino acids on the hardness, F(c), adhesiveness F(a), and turbidity of the solubilized system

Amino acids	F(c)	F(a)	Turbidity
L-Alanine	111.4	109.7	100.0
L-Histidine	114.0	104.3	69.3
L-Arginine	99.7	101.7	54.6
L-Methionine	183.4	161.0	58.2
L-Valine	128.1	129.2	156.7
L-Leucine	172.3	174.6	155.0
L-Phenylalanine	86.5	91.1	98.3
L-Proline	90.8	95.6	239.4
L-Serine	104.4	105.8	249.3
L-Isoleucine	186.0	157.8	598.6
L-Threonine	111.4	110.6	191.5
Na-L-Asparaginate	98.9	104.3	207.0
L-Lysine HCl	102.2	103.5	125.4
Glycine	99.4	101.0	166.0
Na-L-Glutamate	103.6	101.7	188.0
Control (none)	100.0	100.0	100.0

200 mg of the amino acid was added to the standard system of 25 g soy sauce powder, 25 ml cottonseed oil and 10 ml water. The effects were expressed as the percentage of each value to the control. Turbidity was measured on the sample diluted with water.

Lysine-HCl (Lys-HCl) および Sodium asparaginate (Na-Asp) は殆んど影響を与えず, また Proline (Pro) および Phenylalanine (Phe) では却って F(c) を低下させた。F(c) を高めたアミノ酸は F(a) に対しても同様の効果を示して, 生成物は付着性を強めた。このような F(c), F(a) の増強は添加したアミノ酸が水相, 油相相互の親和性を一層強めた結果によるものであり, これらのアミノ酸が可溶化に対して活性成分であることを示すものと考えられた。

Table 1 に各種アミノ酸を標準構成に対して 200 mg (水相部に対し 0.57%) 添加した際の生成物の F(c), F(a) ならびにその 2% 水溶液の示す濁度を, アミノ酸無添加区と比較して示した。前二者に対するアミノ酸の影響は前述のとおりであるが, 濁度とは一致した傾向を示さず, Met では F(c), F(a) を増強したものの濁度は半減し, また Ser, Pro などは濁度にも影響し強めた。この濁度の強弱は可溶化物中の綿実油の分散度を推定せしめるが, 一面, 水中油滴型に変換した際の油滴の安定性に対するアミノ酸の関与を示すものと考えられる。

標準構成中, 粉末醬油と蒸留水からなる水相部に含ま

れる上記の可溶化活性アミノ酸の濃度は, 前報²⁾の Table 3 に示した醬油のアミノ酸組成から, Ileu : 0.69, Leu : 1.08, Met : 0.24, Val : 0.68%等と計算され, これらのアミノ酸濃度が F(c), F(a) および濁度の増強作用を発現するレベルにあることが認められる。すなわち油脂可溶化現象の発現にはこれらのアミノ酸が総合的に可溶化活性成分として関与しているものと考えられた。

2. ペプチドの可溶化に及ぼす影響

醬油中の窒素成分としては遊離のアミノ酸のほかにはペプチドとして存し, 全窒素中 40% 程度を占める。またそのペプチドは殆んどが低級ペプチドであり, 構成アミノ酸は Ozawa ら¹⁰⁾によると Glu, Asp. を主とし, Glycine (Gly), Ser, Val 等からなるとされ, また岡ら¹¹⁾は酸性ペプチドでは N 末端が Asp, Glu で他の構成アミノ酸が Asp, Glu, Gly, Thr (Threonine), Ser 等とし, また中性ペプチドとして Gly-Gly, Gly-Ser, Gly-Pro 等の存在を明らかにしている。一方著者らは前報²⁾において醬油ペプチド中 A. P. L. (平均ペプチド鎖長)の少い低級ペプチドが F(c) を強めることを認めている。そこで Table 2 に示した数種の低級ペプチド製剤を供試し, アミノ酸添加試験と同様にして生成物の性状に及ぼす影響を検討した。本結果は Table 2 に示したように Gly-Glu, Glu-Asp, Phe-Glu が明らかに F(c), F(a) を増強し, Val に相当する程度の活性を示した。また濁度に対しても Phe-Glu, Gly-Gly が増強する傾向を示した。しかしアミノ酸添加試験において強い活性を示した Leu は Leu-Leu のジペプチドの形としては水に対する溶解性が低下し, 生成物の性状には殆んど影響を及ぼさなかった。

Table 2. Effects of some peptides on the hardness, F(c), adhesiveness, F(a) and turbidity of the solubilized system

Peptides	F(c)	F(a)	Turbidity
Glycyl-L-Leucine	100.9	100.9	109.3
Glycyl-Glycine	100.9	104.1	108.3
Glycyl-L-Glutamic acid	119.6	118.4	98.0
L-Leucyl-Glycyl-Glycine	92.1	95.3	105.6
L-Phe-L-Glutamic acid	110.9	106.3	116.7
L-Glutamyl-L-Asparaginic acid	113.7	110.8	94.1
DL-Leucyl-Leucine	103.9	100.9	83.0
Control (none)	100.0	100.0	100.0

100 mg of the peptide was added to the standard system. The effects were expressed as the percentage of each value to the control.

以上の結果のみからは醤油ペプチドの可溶化現象への関与のすべてを明らかにし得ないが、数種のペプチドはアミノ酸と同様に明らかな可溶化活性を有することが認められ、これらのペプチドが可溶化活性アミノ酸と相まって標準構成系において醤油成分に由来する可溶化活性物質として挙動するものと考えられた。

3. 可溶化油量に及ぼすアミノ酸の影響

界面活性剤溶液において界面活性剤濃度を高めると可溶化量が増大することが知られている。そこで先に可溶化活性を認めたアミノ酸を用い、可溶化系におけるそれらのアミノ酸濃度を高めて可溶化油量に及ぼす影響を検討した。すなわち F(c) を増強する添加アミノ酸の濃度

Fig. 3. Effect of amino acids on the amount of oil solubilized in the system
200 mg of Leu (b), Met (c) or Ileu (d) was respectively added to the standard system (a).

Fig. 4. Reduction of the surface tension of water by soy sauce, poly-peptone and some surfactants as a function of concentration

a: water, b: soy sauce, c: poly-peptone, d: soy sauce powder e: glycerol monostearate, f: sorbitan mono-palmitate, g: sucrose fatty acid ester.

レベルとして、標準構成当り 200 mg の添加条件で、まず可溶化物を調製し、引続き攪拌しながらこれに綿実油を滴下し、生成物の硬さ F(c) の変化を測定した。その結果は Fig. 3 に示したように、アミノ酸無添加の対照区に較べ、Ileu, Met および Leu 添加区はいずれも高い F(c) を与え、かつ添加油量の増加に伴い漸増を示した。しかしそれらのピーク位置すなわち可溶化油量限界としてはいずれも一致し、この点を過ぎる油量条件ではもはや油の包容は進行せず、表面に油の遊離を示した。このように標準構成の水相においては可溶化活性のアミノ酸を添加しても可溶化油量としては増加が認められなかった。この理由は、本水相部の物理的性質たとえば凝集性の強さが可溶化油量に対して一つの制限因子になっているものと考えられる。

なお、可溶化油量は本結果では水相量に対しほぼ等量 (v/w) となる値を示し、先の水相量に対して 0.8 倍量とする結果¹⁾と異なったが、これは綿実油の添加方法すなわち可溶化手順の差にもとづくものと考えられた。

4. 可溶化活性と界面活性の関係

Fig. 4 に代表的な界面活性剤と比較して醤油、粉末醤油および先に可溶化に対する活性を認めたポリペプトン²⁾について、それらの水溶液の示す表面張力の測定結果を示した。これらはいずれも水の表面張力を低下させ、界面活性を有することが示された。しかしその発現濃度は界面活性剤で 0.001% であるのに対し醤油等では 0.1% 以上の高濃度であって、界面活性力としては低かった。一方可溶化現象を発現する標準構成の水相部は粉末醤油濃度として約 70% であることから、粉末醤油が本水相下で界面活性的に挙動する濃度域にあることが示された。

アミノ酸の界面活性についてはアミノ酸の一般式 $R-CH(NH_2)COOH$ において R- に疎水基を有するアミノ酸が界面活性を示すことが知られており、実験的にもこれと一致する結果として、Leu, Ileu, Val, Met および Phe が明らかな活性を示して水の表面張力を低下させた。界面活性の発現は Fig. 5 に示したようにいずれも 1% 以上の高濃度で認められたが、この濃度は標準構成の水相中のこれらのアミノ酸と同一濃度レベルにあることから、可溶化系において粉末醤油成分としてのこれらのアミノ酸が界面活性物質として挙動しているものと考えられる。上記したアミノ酸のうち、前四者は先の実験結果が示すように可溶化活性を有して生成物の粘稠性を強めたが、後者の Phe は可溶化を阻害する方向で関与したアミノ酸であり、このことは界面活性アミ

Fig. 5. Reduction of the surface tension of water by amino acids as a function of concentration

a: water, b: Met., c: Val.,
d: Phe., e: Ileu., f: Leu.

Table 3. Effects of some surfactants on the hardness, F(c) and the adhesiveness, F(a) of the solubilized system

Surfactants	F(c)	F(a)
Propylene glycol monostearate	101.9	109.1
Glycerol monostearate	99.1	100.0
Sucrose fatty acid ester	88.1	85.5
Sorbitan monolaurate	87.5	84.6
Sorbitan monopalmitate	100.0	100.0
Sorbitan monostearate	105.0	97.4
Sorbitan monooleate	91.7	89.7
Sorbitan trioleate	105.0	100.0
Control (none)	100.0	100.0

Concentration of surfactants was 0.03% in the system.

ノ酸のすべてが必ずしも可溶化活性アミノ酸として挙動しないことを示すものと考えられた。

次に界面活性剤を用いて、それが界面活性を発現する濃度レベルとして水相中 0.03% になるように標準構成の系に含有させて、生成物の F(c) および F(a) に及ぼす界面活性剤の影響を検討した。その結果、Table 3 に示したように、可溶化を促進する傾向は供試界面活性剤中には認められず、蔗糖脂肪酸エステル等ではむしろ、阻害する傾向が認められた。また界面活性剤の H. L. B. (Hydrophile-Lipophile-Balance) との関係も本結果からは見出せなかった。

これらの結果から、醤油エキスを特定高濃度に含有する水相の示す油脂可溶化現象は醤油エキス中の可溶化活性アミノ酸およびペプチドが、醤油エキスの特定

高濃度条件下で界面活性剤ミセルとして挙動することによりなる現象と考えられ、界面活性剤が cmc (ミセル形成臨界濃度) 以上で発現する可溶化現象に類するものと考えられた。なお、醤油エキスを含有する水相のミセル形成の点ならびに醤油中の非窒素成分の本現象への関与の点に関しては今後明らかにしていきたい。

要 約

粉末醤油、綿実油および水を系としてなる油脂可溶化現象に関し、醤油の窒素成分中の可溶化活性物質の検索を試み、それらの挙動について検討した。

標準構成系にアミノ酸およびペプチド製剤を添加し、これらの生成物の性状に及ぼす影響を検討した結果、Ileu, Met, Leu, Val 等のアルキル基は疎水基として有するアミノ酸が、可溶化物の硬さ、付着性を増強し、また Gly-Glu, Glu-Asp 等のペプチドも同様に活性を有することが認められた。

これらのアミノ酸はいずれも 1% 以上の濃度域で水の表面張力を低下させ、この濃度は可溶化活性を発現するアミノ酸濃度ならびに標準構成の水相の含有するアミノ酸濃度レベルとも一致した。

界面活性剤の添加は可溶化物の性状に殆んど影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、醤油成分による油脂可溶化現象は醤油中の数種の可溶化活性を有するアミノ酸およびペプチドが、醤油中非窒素成分の関与のもとでミセルを形成し、これが難溶性物質としての綿実油を可溶化する現象と考えられた。

終りに本研究を進めるに際し、終始御指導を賜りましたキッコーマン醤油株式会社常務取締役横塚保博士、並びに当社中央研究所 那須野精一博士に深謝いたします。また御懇篤な御指導と本稿の御校閲を賜りました東京農業大学 教授小原哲二郎博士に深く感謝いたします。また実験に御協力いただいた当所豊島隆、針替千恵子の両氏並びに発表を許可された本社役員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 小野文夫・青山康雄：食品工誌，23，306 (1976)。
- 2) 小野文夫・青山康雄：食品工誌，23，544 (1976)。
- 3) 青木 宏・長野宏子：食品工誌，22，320 (1975)。
- 4) 青木 宏・松浦英子：食品工誌，23，26 (1976)。
- 5) 青木 宏・梅沢美千代：食品工誌，23，32 (1976)。
- 6) 柴崎一雄・大久保一良・佐藤隆夫：食品工誌，19，580 (1972)。

-
- 7) 遠藤健一・笹子謙治・山内邦男: 食品工誌, **21**, 431 (1974).
8) 伊藤敏敏・中西武雄: 農化, **48**, 239 (1974).
9) 日本化学会編: 実験化学講座, 第 7 卷, (丸善) p. 14 (1956).
10) OZAWA, Y., SUZUKI, K., TAJIMA, O. and MOGI, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1371 (1972).
11) 岡 智・永田和夫: 48 年度農化大会講演要旨集, p. 98 (1973). (昭和 51 年 5 月 14 日受理)
-