凍結乾燥プラズマの貯蔵中の悪臭生成因子の解析 および低 pH 活性炭処理による悪臭生成の抑制

早川 茂*・平井利枝*・秋田浩之*・中村 良*・佐藤 泰**

Suppression of Off-Flavor Development in Freeze-Dried Plasma during Storage by Charcoal Treatment at Low pH

Shigeru HAYAKAWA*, Rie HIRAI*, Hiroyuki AKITA*,
Ryo NAKAMURA* and Yasushi SATO**

* Faculty of Agriculture, Nagoya University, Furocho,
Chikusa-ku, Nagoya 464-01

** Faculty of Agriculture, Meijo University, 1-501,
Shiogamaguchi, Tenpaku-ku, Nagoya 468

It was attempted to find the components responsible for development of off-flavor in freeze-dried porcine plasma during storage and to find a simple and effective method to remove them. Off-flavor degree (OFD) noticeably developed in freeze-dried plasma after storage at 37°C for 3 weeks and OFD was significantly ($p < 0.01$) correlated to the amount of TBA reactive substances and fluorescence intensity (FI). Off-flavor development was greatly suppressed in freeze-dried plasma processed by ultracentrifugation and charcoal treatment at low pH for diminishing the amount of free fatty acids and phospholipids. The addition of arachidonic acid and phospholipid to the acid-charcoal treated plasma or hemoglobin promoted the increase in FI during storage at 37°C up to 3 weeks, whereas the addition of those compounds to serum albumin caused no change in FI during storage. The addition of hemoglobin to the plasma collected from less hemolyzed blood caused the significant increase in OFD and FI. It was thus suggested that the responsible components for the off-flavor development were hemoglobin, phospholipids and poly-unsaturated fatty acids, which were effectively removed by charcoal treatment at low pH. (Received Jun. 2, 1988)

家畜屠殺の際に得られる血液は約17%の粗蛋白質を含有する¹⁾にもかかわらず従来廃棄処分されるかあるいは飼料として利用されるにとどまっていた。近年、衛生的に血液を採取し、血球と血しょう(プラズマ)とに分別する技術が確立し、食品素材としての利用が求められている²⁾。そして、プラズマ蛋白質の栄養的側面やその良好な機能特性(乳化性、ゲル形成性、保水性等)を生かして加工食品に添加する研究もなされている³⁾。しかしながら、分離したプラズマは卵の代替物として

は蛋白質含量が低く、濃縮させるかあるいは乾燥させることが望ましい。乾燥物は長期間保存できることと、どんな希望の濃度の溶液でもつくることができるという大きな利点を持っている。しかしながら、プラズマを凍結乾燥あるいは噴霧乾燥したのち貯蔵すると、貯蔵日数の増加とともに発生する悪臭が強くなることが報告されている⁴⁾⁵⁾。

そこで、凍結乾燥したプラズマを貯蔵する際に生成する悪臭に対する原因物質の解明ならびにこの原因物質の

* 名古屋大学農学部(〒464-01 名古屋市中種区不老町)

** 名城大学農学部(〒468 名古屋市中天白区塩釜口1-501)

簡便な除去方法について検討を行った。

実 験 方 法

1. 実 験 材 料

クエン酸添加豚血液から遠心分離法により集めた凍結プラズマを伊藤ハムより譲り受けた。このプラズマには 380 nm における吸光度測定により 0.2~0.4 g/dl のヘモグロビンが混入していると計算された。これを実験の際に解凍し、種々の処理を施した後、凍結乾燥した。

低溶血プラズマは豚血液から実験室において溶血させないように注意深く集めたものである。ヘモグロビンの含量は 380 nm における吸光度測定より 0.1 g/dl 前後と計算された。

牛血清アルブミン、牛ヘモグロビン、アラキドン酸、ジパルミトイルホスファチジルコリンはシグマ社より購入した。

2. 超遠心プラズマとプラズマリポ蛋白質 (PLP) の調製

限外ろ過 (分子量 1 万の膜) により 2 倍に濃縮したプラズマ 100 ml に 32 g KBr を溶かし、比重を 1.21 とした後、超遠心分離 (150 000×g, 15°C, 16 hr) を行った。上層のリポ蛋白質部分 (PLP) と下層の溶液部分をそれぞれ集め、生理食塩水に対して 4°C で 2 日間透析した。下層部分は蛋白質含量が 7.5% になるように生理食塩水で希釈して用いた。以後これを超遠心プラズマと呼ぶことにした。PLP は 100 ml あたりリポ蛋白質が 0.5 g になるようにプラズマに添加した。

3. 活性炭処理

所定の pH において所定量の活性炭 (Norit SX-3, 400 mesh) をプラズマに添加し、4°C, 1 時間攪拌した後、遠心分離 (10 000×g, 15 min) により上清を集めた。

4. プラズマの貯蔵

プラズマを凍結乾燥し、乾燥物を乳鉢にて細粉としたのち、特記しないかぎり 37°C で 3 週間貯蔵した。

5. TBA 反応物質および過酸化脂質の測定

TBA 反応物質 (TBA) は松下の方法⁶⁾により測定し、533 nm における吸光度でもって示した。過酸化脂質 (LPO) は八木法⁷⁾ (Liperoxide-test WAKO, 和光純薬) を用いて測定し、プラズマ 1 ml あたり (あるいは蛋白質 75 mg あたり) のマロンジアルデヒドの n mole 数で示した。

6. 蛍光強度 (FI) の測定

試料のプラズマに 10.5 倍量 (v/v) のジクロロメタン-

メタノール (2:1) を加え、よく振とうした後、さらに試料の 4 倍量 (v/v) の 1 N 塩酸を加え、振とうし、遠心分離 (8 000×g, 15 min) を行った。得られた上清を蛍光分光光度計 (JASCO FP-550 A) を用いて 364 nm で励起し、430 nm で測定した。スタンダードとして 0.1 N 硫酸に溶かした 1.0 μg/ml 硫酸キニーネを 15% フルスケールとして用いた。

7. 臭い (OFD) の測定

プラズマを蒸留水で 3 倍ずつ順次希釈し、臭いがほぼ感じられなくなるまでの希釈回数でもって臭いの強さを示した。

8. 重回帰分析

活性炭レベル (1=0.01 g/dl, 2=0.1 g/dl, 3=1.0 g/dl) と pH (2, 3, 4, 5) を変えて超遠心プラズマを処理し、凍結乾燥し、4 週間 37°C で貯蔵した後 LPO と FI を測定した。活性炭レベルと pH に関する LPO と FI の重回帰分析を SAS[®] を用いて行った。また、LPO と FI に対する 3 次元局面図を SAS/GRAPH[®] を用いて描いた。

実験結果及び考察

1. 貯蔵中の悪臭生成および臭いと脂質過酸化物質・蛍光強度との相関

凍結乾燥プラズマを貯蔵すると悪臭が発生することを確認するとともに貯蔵中に増加する TBA 反応物質 (TBA) あるいは蛍光強度 (FI) と臭い (OFD) との相関を調べるために乾燥プラズマの 37°C での各貯蔵期間における TBA, FI, OFD を調べた。Fig. 1 に示したように貯蔵期間の増加とともに TBA, FI, OFD いずれも増加した。TBA と OFD との間および FI と OFD との間にいずれも正の有意の相関が見られた (それぞれ $r=0.977$; $p<0.01$, $r=0.967$; $p<0.01$ であった)。

脂質あるいはリン脂質の過酸化物質と塩基との反応によるシッフ塩基化合物が蛍光を発するという報告⁹⁾¹⁰⁾ がなされていること、乾燥プラズマの貯蔵中の悪臭生成はきわめて少量の酸素の存在下で進行する⁴⁾ こと、そしてプラズマに含まれている遊離脂肪酸、コレステロールエステルおよびリン脂質中の高い不飽和脂肪酸含量¹¹⁾ を考慮するならば、この悪臭生成の原因としてまず不飽和脂肪酸の過酸化が考えられる。

2. 酸性活性炭処理による悪臭生成抑制

遊離脂肪酸を除くために CHEN¹²⁾ の方法によりプラズマを活性炭処理した。また、リン脂質とコレステロー

Fig. 1 Effect of storage at 37°C on off-flavor degree (OFD), lipid peroxide (TBA) and relative fluorescence intensity (FI) in freeze-dried plasma
● ; OFD, ▲ ; TBA, ■ ; FI.

Table 1 Effect of ultracentrifugation and charcoal treatment at pH 3 on free fatty acid and phospholipid contents in freeze-dried plasma

Treatment	Free fatty acid μ Eq/l	Phospholipid mg/dl
Untreated	342(100)	73(100)
Treated with charcoal at pH 3	76(23)	57(78)
Ultracentrifuged and treated with charcoal at pH 3	76(23)	25(34)

Relative values are shown in parentheses.

ルエステルに含まれているリポ蛋白質を除くためにプラズマを超遠心処理した後にさらに活性炭処理を行った。こうして得られたプラズマ中の遊離脂肪酸量とリン脂質量を Table 1 に示した。酸性活性炭処理により遊離脂肪酸は約 1/4 に減少し、超遠心-酸性活性炭処理によりリン脂質は約 1/3 に減少した。また、酸性活性炭処理したプラズマはヘモグロビン由来の色調がかなり減少しており、ヘモグロビンないしはヘムがかなり除かれていると考えられた。

Table 2 に凍結乾燥し、37°C で 3 週間貯蔵した活性

Table 2 Effect of ultracentrifugation and charcoal treatment at pH 3 on lipid peroxide (TBA), relative fluorescence intensity (FI) and off-flavor degree (OFD) in freeze-dried plasma after storage at 37°C for 3 weeks

Treatment	TBA	FI	OFD
Untreated	0.146	5.9	6
Treated with charcoal at pH 3	0.090	1.7	3
Ultracentrifuged and treated with charcoal at pH 3	0.079	1.1	2

炭処理プラズマ中の TBA, FI および OFD を示した。未処理のものにくらべて酸性活性炭処理をしたものは TBA, FI, OFD のいずれもかなり低い値であり、超遠心-活性炭処理のものは活性炭処理だけのものよりさらに低い値であった。

これらの結果より、乾燥プラズマの貯蔵中の悪臭と蛍光物質の増加は遊離脂肪酸およびリポ蛋白質中の不飽和脂肪酸の過酸化によるものであることが強く示唆され、酸性活性炭処理により悪臭と蛍光物質の増加を効果的に抑えることができることがわかった。

CHEN¹²⁾ は血清アルブミンを pH 3 付近で活性炭処理をすることにより血清アルブミンに結合している脂肪酸を効果的に除去できるが、中性付近では脂肪酸をほとんど除去できないことを報告している。本実験においてプラズマを中性で活性炭処理しても悪臭生成抑制にほとんど効果がないという結果が得られた。したがって、この活性炭処理は酸性条件下で行わなければならないということが示唆された。

そこで、酸性活性炭処理による蛍光物質と過酸化脂質増加抑制のための活性炭量と pH に関する最適条件の検討を行った。活性炭レベルを 1~3, pH を 2~5 に変えて処理した超遠心プラズマを凍結乾燥し、37°C で 4 週間貯蔵した後の LPO と FI の値を Table 3 に示した。OFD に関しては測定値が定性的であり、定量性に乏しいことと Fig. 1 に見られるように OFD は FI と相関が高いのでここでは特に OFD の測定は行わなかった。

得られたデータについてコンピューターを用いて重回帰分析を行った結果を Table 4 に示した。LPO, FI いずれの場合にも高い重相関係数を示し、これらのモデルを用いて LPO と FI を十分予測できると考えられた。

Table 3 Effect of charcoal treatment under various conditions on lipid peroxide value (LPO) and relative fluorescence intensity (FI) in freeze-dried plasma after storage at 37°C for 4 weeks

Treatment condition		LPO ^{b)}	FI
pH	CC ^{a)}		
2	1	0.27	5.4
2	2	0.20	6.3
2	3	0.35	6.3
3	1	0.19	2.1
3	2	0.12	2.0
3	3	0.23	1.9
4	1	0.28	2.0
4	2	0.22	2.1
4	3	0.33	1.9
5	1	0.36	2.8
5	2	0.32	2.4
5	3	0.41	2.0

^{a)} charcoal level : 1=0.01 g/dl, 2=0.1 g/dl, 3=1.0 g/dl

^{b)} nmole malondialdehyde/ml plasma

Table 4 Regression models for prediction of lipid peroxide value (LPO) and relative fluorescence intensity (FI) in freeze-dried plasma after storage at 37°C for 4 weeks

Regression model	Coefficient	
	LPO	FI
Constant	0.84	17.25
pH	-0.27	-8.33
CC	-0.31	1.50
pH ²	-0.044	1.11
CC ²	0.087	-0.17
pH · CC	-0.004	-0.24
R ² value	0.91	0.94
Probability	<0.01	<0.01

そして、これらの回帰係数を用いてコンピューターにより 3 次元局面図を描かせた (Fig. 2)。FI の低下には活性炭の量にはあまり関係なくごく少量添加すれば効果があり、pH は 4 付近で最も効果があることがわかった。また、LPO の低下には活性炭量と pH のいずれもかなり影響し、活性炭量 0.07 g/dl, pH 3.1 で LPO が最

Fig. 2 Three-dimensional surface plots of FI and LPO in freeze-dried plasma stored at 37°C for 4 weeks as functions of pH and charcoal level (CC)

A. Fluorescence intensity (FI), B. Lipid peroxide (LPO)
CC is the same as that in Table 3.

小となると予測された。

3. 酸性活性炭処理プラズマへの不飽和脂肪酸とリン脂質の添加の影響

乾燥貯蔵プラズマの悪臭生成および蛍光物質の増加が過酸化脂質によるものであることを確認するために超遠心-活性炭処理プラズマに多価不飽和脂肪酸の代表であるアラキドン酸とリン脂質としてホスファチジルコリンあるいはリポ蛋白質を添加して乾燥貯蔵し、FI と LPO を測定した。アラキドン酸自体がかなり強い臭いがするため OFD の測定は行わなかった。乾燥していないプラズマもアラキドン酸と同種の臭い即ちアルデヒドやケトンのような過酸化脂質の分解臭がいくぶんするが、この臭いは乾燥貯蔵したプラズマの臭いである魚臭様悪臭とは異なると思われた。

Table 5 に示したように、アラキドン酸を添加しな

Table 5 Effect of the addition of arachidonic acid and phospholipid on lipid peroxide value (LPO) and relative fluorescence intensity (FI) in acid-charcoal treated plasma after storage at 37°C up to 3 weeks (W)

Additives		FI			LPO		
AA ^{a)}	PL ^{b)}	0W	1W	3W	0W	1W	3W
—	—	1.5	1.5	1.9	0.14	0.14	0.14
—	PC	1.5	1.5	1.9	0.17	0.14	0.17
—	PLP	1.9	1.9	1.9	0.20	0.15	0.14
+	—	1.9	3.4	3.8	0.26	0.25	0.40
+	PC	1.9	2.6	3.4	0.41	0.40	0.40
+	PLP	1.9	3.8	4.1	0.43	0.37	0.39

^{a)} — ; no arachidonic acid, + ; 0.02 g/d/ arachidonic acid

^{b)} — ; no phospholipid, PC ; 0.1 g/d/ dipalmytoyl phosphatidyl choline, PLP ; 0.5 g/d/ plasma lipoprotein

かった場合には貯蔵中の FI の増加は見られなかったが、アラキドン酸を添加した場合は FI が貯蔵 3 週間で 2 倍に増加した。一方、LPO はアラキドン酸を添加した場合にすでに高い値であり、貯蔵中における変化は見られなかった。ただし、アラキドン酸のみを添加し、リン脂質を添加していない場合には貯蔵 0.1 週間では低く、貯蔵 3 週間ではリン脂質を添加した場合と同じ値となった。そのため、結果的に LPO が貯蔵中に増加したかのように見えるが、この原因については不明である。

4. 血清アルブミンへの不飽和脂肪酸とリン脂質の添加の影響

前述のようにアラキドン酸の添加により FI が増加することが認められた。しかしながら、リン脂質の有無に

よる変化は見られなかった。これは超遠心-活性炭処理プラズマ中にまだいくらかのリン脂質が残っていたためであるかもしれないと考えられた。そこで、プラズマの代わりに精製血清アルブミンを用いたより単純な系にしてアラキドン酸とリン脂質を添加して乾燥貯蔵し、FI と OFD を測定した。

Table 6 に示したように、リボ蛋白質を添加したものでは LPO が貯蔵前にすでに高い値であったが、貯蔵中にはその増加はみられなかった。FI はいずれの場合でも貯蔵中の増加は認められなかった。したがって、プラズマを用いたときの FI の増加を再現することはできなかった。そこで、過酸化反応をより促進するためにフェントン試薬 (0.1 mM Cu²⁺, 2.5 mM H₂O₂) をアラ

Table 6 Effect of the addition of arachidonic acid and phospholipid on lipid peroxide value (LPO) and relative fluorescence intensity (FI) in bovine serum albumin after storage at 37°C up to 3 weeks (W)

Additives		FI			LPO		
AA ^{a)}	PL ^{b)}	0W	1W	3W	0W	1W	3W
—	—	2.0	2.5	2.0	0.13	0.14	0.16
—	PC	1.5	2.0	1.5	0.16	0.16	0.21
—	PLP	2.5	2.0	2.0	0.65	0.65	0.85
+	—	2.5	2.0	2.0	0.30	0.26	0.40
+	PC	2.5	2.0	2.0	0.27	0.35	0.41
+	PLP	2.0	2.0	2.5	1.25	nd ^{c)}	1.20

^{a)} — ; no arachidonic acid, + ; 0.02 g/d/ arachidonic acid

^{b)} — ; no phospholipid, PC ; 0.1 g/d/ dipalmytoyl phosphatidyl choline, PLP ; 0.5 g/d/ plasma lipoprotein

^{c)} not determined

Table 7 Effect of the addition of hemoglobin on relative fluorescence intensity (FI) and off-flavor degree (OFD) in the freeze-dried plasma after storage at 37°C for 3 weeks (W)

	FI			OFD		
	0W	1W	3W	0W	1W	3W
ACP ^{a)}	0.8	2.6	2.7	1	2	3
0	1.3	2.6	2.8	1	3	4
0.1	1.1	3.4	3.3	1	3	4
0.2	1.4	4.7	4.5	1	4	5
0.4	1.4	4.3	5.4	2	5	5
0.8	1.9	5.0	5.5	2	4	6
1.6	1.6	6.3	6.2	2	5	6

^{a)} Acid-charcoal treated plasma without additional hemoglobin.

キドン酸とリン脂質を含む血清アルブミン溶液に添加して乾燥貯蔵したが、FI の増加は見られなかった。したがって、プラズマの乾燥貯蔵の系を再現させるためにはまだ何か足りない要因があると考えられた。

5. プラズマへのヘモグロビンの添加の影響

前述のように血清アルブミンにアラキドン酸とリン脂質を添加しても FI の増加は見られなかったの、これらにさらにヘモグロビンを添加するかあるいはヘモグロビンにアラキドン酸とリン脂質を添加して乾燥貯蔵したところ 1 週間の貯蔵で FI が 2 倍に増加した。

この結果から、プラズマの乾燥貯蔵中の蛍光物質と悪臭増加にヘモグロビンが大きく影響すると考えられた。これを確認するために低溶血プラズマを調製し、これにヘモグロビンを添加して乾燥貯蔵を行った結果を Table 7 に示した。

低溶血プラズマにおいても少量 (0.1 g/dl 前後) のヘモグロビンが含まれているために貯蔵により OFD が増加するが、酸性活性炭処理により OFD の増加を若干抑えることができる。そして、添加したヘモグロビンの量が增大するにしたがい貯蔵中の FI, OFD が増加することが分かった。

6. 悪臭生成機構とその抑制法の検討

以上の結果より、プラズマの乾燥貯蔵中の悪臭の増加とこれに付随する蛍光物質の増加は次のような機構により起こると考えられた。プラズマ中の遊離脂肪酸やリポ蛋白質を構成しているリン脂質とコレステロールエステルに含まれている多価不飽和脂肪酸がヘモグロビンのヘム鉄により過酸化を受ける。この過酸化物がさらにヘモグロビン中のアミノ基とアミノカルボニル反応を起こすことにより悪臭と蛍光物質が生成する。

したがって、悪臭生成を防ぐためには採血のさいにプラズマにヘモグロビンが混入しないようにする必要がある。しかしながら、溶血を防ぐことは技術的には非常に難しいので、プラズマを分別したのちにヘモグロビンを除くことが望ましい。そのための方法として、本報で用いた酸性活性炭処理法が有効である。この方法は血清アルブミンに結合している遊離脂肪酸を効果的に除去できる¹²⁾という利点を合せ持っている。また、ヘモグロビンのヘムだけを除くならば、すでに報告されているカルボキシメチルセルロースを用いる方法¹³⁾¹⁴⁾が有効である。

酸性活性炭処理をした後にプラズマを中性に戻すと白濁し、一部の蛋白質 (全蛋白質のおよそ 2~3% 相当) が不溶化することが観察された。また、酸性活性炭処理によりプラズマ蛋白質の乳化性が低下することが斎藤ら¹⁵⁾によって報告されている。したがって、乾燥貯蔵プラズマからの悪臭生成抑制のためには酸性活性炭処理が有効ではあるが、より温和な方法を今後見出ししていく努力をする必要がある。

乾燥をしていないプラズマにおいてもかなりの量の過酸化脂質や蛍光物質が検出されることから、プラズマを添加物として食品に利用する場合にはあらかじめ過酸化脂質や蛍光物質を除いた精製プラズマを用いることが望ましい。

要 約

凍結乾燥したプラズマを貯蔵する際に生成する悪臭に対する原因物質の解明ならびにこの原因物質の簡便な除去方法について検討を行った。

乾燥プラズマの貯蔵中に増大する悪臭 (OFD) は

光強度 (FI) や TBA 反応物質 (TBA) の増加と正の有意の相関が見られた。超遠心および酸性での活性炭処理により多くの量のリン脂質と遊離脂肪酸を除去したプラズマを乾燥貯蔵すると悪臭の生成がかなり抑えられた。超遠心-酸性活性炭処理プラズマあるいはヘモグロビンにアラキドン酸とリン脂質を加えて乾燥貯蔵すると FI の増加が見られたが、血清アルブミンにアラキドン酸とリン脂質を加えても FI の増加は見られなかった。低溶血プラズマにヘモグロビンを加えて乾燥貯蔵した場合、ヘモグロビンの量が多いほど OFD と FI が増加した。これらの結果からリン脂質と遊離脂肪酸およびヘモグロビンが凍結乾燥プラズマの貯蔵中の悪臭生成の原因物質と考えられた。そして、これらの物質は酸性活性炭処理によりある程度除去できることがわかった。

本研究は伊藤記念財団研究助成金によったことを記すとともに謝意を表する。

文 献

- 1) RANKEN, M.D.: *Applied Protein Chem.* ed by GRANT, R.A., (Appl. Sci. Pub. London), p. 169 (1980).
- 2) WISMER-PEDERSEN, J.: *Fleischwirtschaft*, **60** (2), 231 (1980).
- 3) NAKAJIMA, Y. and UMEDA, M.: *New Food Industry*, **26**, 57 (1984).
- 4) BROOKS, J. and RATCLIFF, P.W.: *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 486 (1959).
- 5) RATCLIFF, P.W. and BROOKS, J.: *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 625 (1959).
- 6) 松下雪郎: 栄養と食糧 **34**, 523 (1981).
- 7) YAGI, K.: *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976).
- 8) SAS: "SAS User's Guide: Statistics", "SAS/GRAPH User's Guide", (SAS Institute Inc., Cary, NC), (1985).
- 9) MALSHET, V.G. and TAPPEL, A.L.: *Lipid*, **8**, 194 (1973).
- 10) BIDLACK, W.R. and TAPPEL, A.L.: *Lipid*, **8**, 20 (1973).
- 11) FREEMAN, N.K., LINDGREN, F.T. and NICHOLS, A.V.: *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, Vol. 6 (Pergamon Press), p. 215 (1963).
- 12) CHEN, R.F.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 173 (1967).
- 13) SATO, Y., HAYAKAWA, S. and HAYAKAWA, M.: *J. Food Technol.*, **16**, 81 (1981).
- 14) HAYAKAWA, S., MATSUURA, Y., NAKAMURA, R. and SATO, Y.: *J. Food Sci.*, **51**, 786 (1986).
- 15) 斎藤昌義・清水 誠・山内邦男: 日食工誌, **34**, 223 (1987).

(昭和 63 年 6 月 2 日受理)