卵白アルブミン加水分解物の酸化防止性 および α -トコフェロールとの相乗効果

幡 手 英 雄*

Antioxidative Activity of Ovalbumin Hydrolysates and their Synergistic Effects with α -Tocopherol

Hideo HATATE*

* *Department of Food Science and Technology, National
Fisheries University, 2-7-1, Nagatahonmachi,
Shimonoseki-shi, Yamaguchi 759-65*

The ovalbumin hydrolysates (OA-H) prepared with pepsin showed stronger antioxidative activity than those prepared with trypsin or α -chymotrypsin against oxidation of linoleic acid in an ethanol-phosphate buffer (pH 7.0) system. Nevertheless, the potent synergistic effects of the OA-H with α -tocopherol were more attractive phenomena in their practical use because the antioxidative activity of α -tocopherol was strongly enhanced by the combined use of the OA-H. Among the various kinds of peptides presented in the OA-H, the particular peptides with relatively high molecular weight appeared to act as an available synergist for α -tocopherol. (Received May 1, 1995)

近年、合成酸化防止剤の人体に対する悪影響が指摘され、様々な素材から酸化防止成分がスクリーニングされている。しかし、安全性や有効性の点から依然としてトコフェロールが汎用されている現状では、新規酸化防止剤の開発と同様に、既存の酸化防止剤の効力を高める物質、すなわち、シナージストの開発も重要な研究課題である。このような状況から筆者らはウシ血清アルブミン¹⁾やマイワシの筋原繊維タンパク質²⁾をプロテアーゼ処理することにより各種酸化防止剤と相乗効果を示す加水分解物を調製できることを明らかにした。本研究では、生産過剰状態にある鶏卵の多角的な利用や新たな応用を目的とし、卵白アルブミンを原料として酸化防止性ペプチドあるいは α -トコフェロールの有効なシナ-

ジストの開発を試みた。

実 験 方 法

前報¹⁾に従って卵白アルブミン(OA、シグマ社製)の0.5%溶液にペプシン(ブタ胃粘膜、シグマ社製、結晶、凍結乾燥)、トリプシン(ウシすい臓、シグマ社製、2回結晶)または α -キモトリプシン(ウシすい臓、シグマ社製、3回結晶)を100:1(OA:酵素, w/w)の割合で添加し、37℃で一定時間反応させてOA加水分解物(OA-H)を調製した。必要に応じてOA-H溶液(50 ml)を遠心分離(2500 rpm, 30分間)し、その上澄液を 1×10^{-3} M HClを溶出液としてセファデックス G-25 (super fine) カラム(2.2×111.5 cm)で分画した(流速0.3 ml/min)。有用な画分についてはWakosil 5C 18-200 T カラム(4.6×250 mm, 和光純薬工業製)を用いて高速液体クロマトグラフ(HPLC, 島津製作所製 LC-6A)で分離した。各種OA-Hの濃度は2, 4, 6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid (和光純薬工業製, TNBS)法³⁾で測定した。

各種OA-Hの酸化防止性および α -トコフェロール(和光純薬工業製, Toc)との相乗効果の判定は山口らの方法⁴⁾に準じた¹⁾。すなわち、10 mmol リノール酸(和光純薬工業製)を含むエタノール2 ml, 0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.0) 2 ml および蒸留水1 ml 計5 mlの混合液を調製し、リノール酸の酸化モデル系を設定した。この酸化モデル系にOA-HやToc(50 μ g)を添加し、60℃の暗所で自動酸化させた。リノール酸の酸化の進行程度はチオシアン酸鉄法⁵⁾で測定し、過酸化価が100 meq/kgに達するのに要する日数(誘導期)でOA-Hの酸化防止力やTocとの相乗効果の強弱を判定した。

結果および考察

OAをペプシン、トリプシンまたは α -キモトリプシンで0~24時間酵素処理し、生成したOA-Hの分解程度、酸化防止性およびTocとの相乗効果を調べ、その結果をTable 1に示す。なお、6 N HClで110℃、24時間加水分解したOAの加水分解率を100%とした。いずれの酵素によってもOAの加水分解率は酵素処理時間の延長につれて上昇したが、3時間以降の上昇は緩やかであった。また、ペプシン処理により他の酵素よりも高い分解率のOA-Hが調製されることが示された。OA-Hの酸化防止力は加水分解率や酵素の種類により異なっており、ペプシンで調製された分解率20%程度のOA-H

* 水産大学校製造学科 (〒759-65 下関市永田本町 2-7-1)

Table 1 Antioxidative activity of OA-H* and their synergistic effects with Toc*

	Hydrolytic period (h)*	Hydrolysis rate of OA (%)*	Induction period (days)**	
			A.A.***	S.E.****
Pepsin	0	7.4	3.8	6.2
	1	15.8	5.8	7.4
	3	19.1	8.7	10.6
	9	20.3	7.8	18.3
	24	23.4	9.1	5.7
Trypsin	0	2.9	1.5	1.8
	1	7.3	2.6	2.6
	3	9.1	4.2	7.0
	9	11.5	4.0	9.7
	24	14.3	2.7	13.5
α -Chymotrypsin	0	2.7	2.6	4.0
	1	3.7	2.3	6.0
	3	4.2	2.5	11.2
	9	5.1	3.2	15.2
	24	6.0	3.6	14.3
Control			0.9	2.4

* OA : Ovalbumin, OA-H : Ovalbumin hydrolysates, Toc : α -Tocopherol. The OA (0.5%, w/v) was hydrolyzed with pepsin, trypsin, or α -chymotrypsin at 37°C for the prescribed periods at the ratio of 100 : 1 (OA/enzyme, w/w). Hydrolysis rate of OA which was hydrolyzed with 6 N HCl for 24 h at 110°C was taken as 100%. ** Induction period indicates days to reach 100 meq/kg of the peroxide value.

*** A.A. : Antioxidative activity of OA-H. The OA-H (50 μ l) were used for the assay of antioxidative activity. **** S.E. : Synergistic effects of OA-H with Toc. The OA-H (5 μ l) were used for the assay of synergistic effects with Toc (50 μ g).

で強い酸化防止性が認められた。OA-H の加水分解率はいずれの酵素で調製しても 25% 以下であり、それ以上加水分解された OA-H の酸化防止性については断言できないが、高い分解率の OA-H は強い酸化防止性を発現しうるものと推察された。OA-H と Toc との相乗効果に関しては、ペプシン処理して調製された OA-H は勿論のこと、単独使用したときには、それほど強い酸化防止性を示さなかったトリプシンや α -キモトリプシンで 3~24 時間処理して調製された OA-H にも Toc に対して強い相乗効果が認められた。

含窒素化合物であるタンパク質、ペプチドあるいはアミノ酸の酸化防止性やシナジストとしての作用機構はいまだに明確にされておらず、酸化触媒物質（金属）をキレートして不活性化する作用⁶⁾や酸化防止剤や脂質過酸化に生じたラジカルの捕捉剤として働くことなどが推察されている。CHEN ら⁷⁾は、乳脂肪の酸化に対する各種アミノ酸の酸化防止性を検討し、シスチン、トリプ

トファンやチロシンの側鎖ならびに α -アミノ基が酸化防止性の発現に関与していることを指摘している。この報告と本実験とでは酸化条件や対象試料が異なっているが、酵素加水分解によって新たに生成した遊離アミノ基が OA-H の酸化防止性の増強に寄与したものと推察される。一方、OA-H により Toc の酸化防止性が著しく向上されたが、その作用機作に関しては現在のところ明らかではなく、今後の重要な検討課題と思われる。

本研究では基質特異性が異なるプロテアーゼ類を使用して OA-H を調製したので、異なる N-, C-末端アミノ酸残基のペプチドが作製されたことが予想される。しかしながら、いずれの酵素で調製した OA-H も強いシナジストとして作用したことから、シナジストとして機能するうえで末端アミノ酸残基は決定的な要因とは考えられず、むしろペプチドの分子サイズや構成アミノ酸残基の種類が重要な要因であろう^{1)~3)}。なお、Table 1 から明らかなように、OA-H は酸化防止剤としてより

も Toc などの酸化防止剤のシナジストとして利用されるほうがより実地的である。

ペプシンで9時間処理して調製された OA-H をセファデックス G-25 により分子サイズに基づいて分離し、各画分 0.25 ml と Toc との相乗効果を検討した (Fig. 1)。OA-H はいくつかのピークに分離され、試験管番号 31~40 (B 画分) に多量のペプチドの溶出および Toc との強い相乗効果が検出された。また、void volume に溶出された分解程度の低いペプチドを含む A 画分にも相乗効果が認められた。他方、低分子サイズのペプチドの溶出が推定される C、D 画分では強い相乗効果は認められなかった。さらに、A~D 画分を回収し、各々の濃度を 15 nmol に調整したものについて Toc との相乗効果を比較した (Fig. 1)。この場合も B 画分には強い相乗効果が認められたが、添加量の減少により C、D 画分さらに A 画分にも有効な相乗効果が認められなかった。なお、D 画分がカラム容量 (424 ml) を越えて溶出されたことは、このクロマト法においては分子サイズだけでなく、吸着作用などによる分離効果も含まれていることを意味しており、分子サイズを正確に反映して

Fig. 1 Separation of OA-H by chromatography on Sephadex G-25, and synergistic effects of the fractions with Toc

The OA-H were prepared by the hydrolysis with pepsin for 9 h at 37°C. An aliquot (0.25 ml) of the fractions eluted was added to the antioxidative assay system in the presence of Toc (50 µg). The fractions A-D were recovered, respectively, and each fraction (15 nmol) was examined on its synergistic effect with Toc. Numbers in parenthesis indicate the induction period (days) of the fractions A-D.

● : Induction period, ○ : Amount of amino group, : Absorbance at 254 nm.

いるとはいえない。しかし、ゲルクロマトグラムにおける溶出位置から判断すると、比較的分子サイズの大きいペプチドが強い相乗効果を有するものと推察される。このことは Table 1 に示した加水分解率の低い OA-H に強い相乗効果が認められた結果とも合致している。すなわち、必要以上の加水分解は OA-H のシナジストとしての機能を低減させる可能性がある。

次に B 画分を HPLC で分離し、出現した多数のピークのうち比較的明瞭なピーク 1~7 (15 nmol) につい

Fig. 2 HPLC of fraction B obtained from OA-H by Sephadex G-25, and synergistic effects of separated peptides with Toc

Gradient elution was carried out from 20% acetonitrile to 40% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid for 50 min at a flow rate of 0.5 ml/min. The prominent peaks 1-7 observed were recovered, respectively, and each peak (15 nmol) was examined on its synergistic effect with Toc. Numbers in parenthesis indicate the induction period (days).

て Toc との相乗効果を検討した (Fig. 2). 強い相乗効果はピーク 3 と 6 で認められ, 有効な特定のペプチドシナージストが B 画分に存在することが示唆された. これらのペプチドの構造については現在検討中であるが, 既報⁸⁾ のウシ血清アルブミン加水分解物由来のペプチドシナージストとの構造活性相関が認められれば, 不明な点の多い窒素化合物のシナージスト機構を解明するうえで有力な手掛かりとなろう. また, OA-H は食品関連分野だけでなく, 生体内における過酸化脂質の制御が重要な問題となっている医薬学分野での応用も期待される.

要 約

OA を基質特異性の異なるペプシン, トリプシンまたは α -キモトリプシンで 0~24 時間酵素処理し, 分解程度の異なる OA-H を調製した. OA-H の酸化防止性は OA の加水分解程度に依存し, ペプシン処理された分解率約 20% の OA-H が有効であった. 他方, いずれの酵素で調製された OA-H も Toc との強い相乗効果を発現し, 分解程度はそれほど重要な要因ではなかった. また, ペプシン処理して調製された OA-H の中で比較的に分

子サイズの大きいペプチドが Toc と強い相乗効果を発現すること, その作用の発現に特定のペプチドが関与していることが示唆された.

文 献

- 1) 幡手英雄・永田吉充・河内正通: 油化学, **39**, 42 (1990).
- 2) HATATE, H., NUMATA, Y. and KOCHI, M.: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1011 (1990).
- 3) OKUYAMA, T. and SATAKE, K.: *J. Biochem.*, **47**, 454 (1960).
- 4) 山口直彦・横尾良夫・藤巻正夫: 日食工誌, **22**, 431 (1974).
- 5) 満田久輝・安本教傳・岩見公和: 栄養と食糧, **19**, 210 (1966).
- 6) 山庄司志朗・吉田弘美・梶本五郎: 油化学, **26**, 28 (1977).
- 7) CHEN, Z.Y. and NAWAR, W.W.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 47 (1991).
- 8) HATATE, H., KUSUNOKI, K. and KOCHI, M.: *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, **42**, 168 (1993).
(平成 7 年 5 月 1 日受理)