

氏 名(国籍)	陳 <sup>チン</sup> 華 <sup>カ</sup> 敏 <sup>ビン</sup>
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 5 2 4 号
学位授与年月日	平 成 8 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学位論文題目	大豆タンパク質由来ペプチドとオカラ煮 熟物の抗酸化性に関する研究
論文審査委員(主査)	教 授 村 本 光 二 教 授 大久保 一 良 教 授 藤 本 健四郎

# 論文内容要旨

## 緒論

不飽和脂肪酸の酸化によって生じる過酸化物質やフリーラジカルは、食品の風味や栄養価などを損ない、品質の劣化を引き起こすだけでなく、生体においては疾病や老化などに悪影響を及ぼすといわれており、酸化の抑制は今日の重要な研究課題となっている。食品に含まれる不飽和脂肪酸の酸化を抑制するためには、酸素、温度、光、微量金属などのような酸化促進因子を除いたり、抗酸化剤の添加が用いられている。食品に使用されている抗酸化剤には多くのものがあるが、トコフェロールはもっとも広く使用されているものの植物油への効果は弱く、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)やブチルヒドロキシトルエン(BHT)のような合成抗酸化剤が安全性の問題などから消費者から敬遠される現在の状況下では、より安全な新しい天然起源の抗酸化剤の開発が望まれている。とくに従来からの抗酸化剤はほとんどが脂溶性であり、有効な水溶性抗酸化剤の開発が望まれている。

大豆タンパク質などの食品タンパク質を酵素で分解すると、抗酸化性をもつようになることが以前より知られていた。しかし、食品タンパク質の分解物は非常に多種類のペプチドから構成されており、個々のペプチドの抗酸化特性についてはほとんど不明のままである。食品タンパク質分解物を抗酸化剤として活用するためには、まず抗酸化ペプチドの化学的特性や機能特性を解明する必要があると考えられる。

そこで本論文では、大豆タンパク質の酵素分解物に含まれる抗酸化ペプチドについて以下の研究を行った。第一章では、酵素分解物から抗酸化ペプチドを単離し、それらの化学構造を解析した。第二章では、大豆抗酸化ペプチドをモデルにして化学合成した一連のペプチドの構造と抗酸化性の相関性を検討した。また、非ペプチド性の抗酸化剤との相乗効果を調べ、さらにペプチドの抗酸化機構を検討するために、ペプチドの金属キレート形成作用やフリーラジカルの捕捉効果を調べた。第三章では、同じ大豆に起源し、豆腐製造の副産物であるオカラの煮熟物に見出した抗酸化性の作用機構について検討を行った。

## 第一章 大豆タンパク質由来抗酸化ペプチドの分離と分析

### 第一節 大豆タンパク質の酵素分解と分解物の抗酸化性

ミヤギシロメ種の脱脂大豆粉から主要タンパク質である $\beta$ -コングリシニンとグリシニンを調製した。ペプシン及びプロテアーゼ M、N、P、S (天野製薬)を用い、それぞれの酵素の最適条件下で大豆タンパク質を加水分解した。水溶液系におけるリノール酸に対するタンパク質分解物の抗酸化性をロダン鉄法により調べた。経時的に分解物の分解率と抗酸化力を測定した(Figure 1)。ペプシンを除き、いずれの酵素でもタンパク質の酵素分解によって抗酸化力が増し、分解時間によって抗酸化性が変化した。 $\beta$ -コングリシニンのプロテアーゼ S とプロテアーゼ N の酵素分解では、分解率が同じであるにもかかわらず抗酸化性の強さに大きな違いがみられた。このことは、酵素の基質特異性の違いによって同一タンパク質から生成された異なるアミノ酸配列をもつペプチドがそれぞれ異なる抗酸化性をもつことを示している。5種類の酵素の中ではプロテアーゼ S が最も強い抗酸化性をもつ分解物を与えた。

## 第二節 大豆タンパク質分解物からの抗酸化ペプチドの精製

大豆  $\beta$ -コングリシニン(1.0 g)のプロテアーゼ S 分解物を Figure 2 の方法で調製した。タンパク質を1時間酵素分解後、不溶性部分を除去、上清を凍結乾燥して579 mg を得た。これをゲル濾過クロマトグラフィーにより分離し、280nmの吸光度と抗酸化力を測定して画分 I (92 mg)、II (36 mg)、III (272 mg)に分けた(Figure 3)。これらの画分を逆相分配系高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離し、抗酸化力を測定した。画分 III からは32個のフラグメントピークを分離した(Figure 4)。この中で特に抗酸化力が強かった5つのフラグメント F1 ~ F5 を、異なる条件下で再度逆相 HPLCにかけ、ペプチドを分離精製した(Figure 5)。F1 ~ F5 の逆相 HPLCによって多くのペプチドピークが検出されたが、少数のピークにのみ効力がみられ、これら P1 から P6の抗酸化ペプチドについて構造解析を行った。

## 第三節 抗酸化ペプチドの構造解析

単離した6種類の抗酸化ペプチドの分子量及びアミノ酸組成をエレクトロスプレー質量分析とアミノ酸分析により調べた後、気相プロテインシーケンサーを使いアミノ酸配列を決定した(Table 1)。これらの抗酸化ペプチドには、バリン、ロイシンのような疎水性アミノ酸がN末端に位置していた。また、金属イオンまたは脂質ヒドロペルオキシドの存在で酸化を受けやすいプロリンがすべての配列に存在し、さらにアミノ酸自体でも一重項酸素の消去作用や金属イオンとのキレート作用が知られているヒスチジンとチロシンが多く含まれていた。1 g の  $\beta$ -コングリシニンを酵素加水分解し、ゲル濾過クロマトグラフィーと逆相HPLCにより精製した6種類の抗酸化ペプチドの収量は、アミノ酸分析値から計算すると P1=2  $\mu$ g、P2=5  $\mu$ g、P3=3  $\mu$ g、P4=345  $\mu$ g、P5=245  $\mu$ g、P6=1943  $\mu$ gであった。これらのペプチドのアミノ酸配列は、報告されている大豆タンパク質の塩基配列との比較から、Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn と Leu-Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn は  $\beta$ -コングリシニンの  $\beta$  サブユニット、Leu-Leu-Pro-His-His と Leu-Leu-Pro-His-His-Ala-Asp-Ala-Asp-Tyr は  $\alpha'$  サブユニット、Val-Ile-Pro-Ala-Gly-Tyr-Pro と Leu-Gln-Ser-Gly-Asp-Ala-Leu-Arg-Val-Pro-Ser-Gly-Thr-Thr-Tyr-Tyr は  $\alpha$  サブユニットに存在していることが確認できた。

## 第二章 大豆 $\beta$ -コングリシニン由来抗酸化ペプチドの構造と抗酸化性の相関

### 第一節 抗酸化性測定法の評価

本研究ではペプチドの抗酸化性測定に、リノール酸の自動酸化測定に用いられるログダン鉄法を用いた。実験に先立ち、リノール酸の自動酸化条件およびログダン鉄法の評価をHPLCを用いて行った。エタノール・リン酸緩衝液の均一溶液系でリノール酸を自動酸化させ、経時的に反応液をログダン鉄法と逆相HPLCで分析した。HPLCのクロマトグラムから、酸化によりリノール酸からヒドロペルオキシドが生成し、さらに酸化が進むとヒドロペルオキシドが二次生成物に分解されることが確認された。リノール酸ヒドロペルオキシドの面積の変動はログダン鉄法の吸光度に対応し、酸化が進行すると次第に最大値に達し、そのうち徐々に減少した(Figure 6)。その間リノール酸量は酸化に伴って減少し、ヒドロペルオキシドの二次生成物が増加するのが HPLC で確認された。これらの結果から、ペプチドの抗酸化性測定には簡便性に優れたログダン鉄法を用いることにした。

## 第二節 抗酸化ペプチドの構造活性相関

大豆タンパク質 $\beta$ -コングリシニンのプロテアーゼS分解物から単離した抗酸化ペプチドLeu-Leu-Pro-His-His(LLPHH)をモデルとして、ヒスチジンの位置と数、プロリンの位置、ロイシンの位置と数、さらにヒスチジンの代わりにチロシンを導入したLLPHHの関連ペプチドを化学合成し、これらのペプチドとBHAおよびBHTとの抗酸化性を比較した。LLPHHは、 $5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ から $4.0 \times 10^{-4} \text{M}$ の範囲でBHTより弱く、BHAより若干強い抗酸化性を示した(Figure 7)。LLPHHのN末端ロイシンを除去しても抗酸化性には大きな影響がなかった。一方、C末端のヒスチジンを除去したLPHHとHLにはこの濃度範囲で抗酸化性がみられなかった。

ペプチドの構造と抗酸化性の相関性を、水溶液系におけるリノール酸の自動酸化に対する $40 \mu\text{M}$ のペプチドの抗酸化性で調べ、次のような結果を得た(Figure 8)。(a)LLPHHHはLLPHHとほぼ同じ抗酸化力を示したが、LPHHでは活性を失った。LLPHHのN末端を1残基ずつ除去したLPHH、PHHおよびHHには活性が認められ、PHHには特に強い抗酸化性がみられた。しかし、HHはLLPHHほど強くなかった。(b)HHのN末端に1残基のロイシンを結合したLHHでも強い抗酸化性を示した。また、LHHのN末端にもう1残基ロイシンを結合したLLHHでは抗酸化力が弱くなり、プロリンを結合したPLHHには抗酸化力がみられなかった。(c)HHの間に1残基あるいは2残基のプロリン、ロイシンを挿入したペプチドHPLL、HPLHおよびHPLHには抗酸化性がなかった。LPHH、HLHP、HLHおよびHPHはLPHHと同程度の抗酸化性を示した。(d)抗酸化性をもつペプチドLLPHHとLPHHの逆向き配列であるHHPLLとHHPLも抗酸化性を示したが、抗酸化性をもたないPLHHとHPLHの逆向き配列HHLPLとHPLHにはやはり抗酸化性がみられなかった。一方、抗酸化性をもっていないHPLLとHLの逆向き配列LPHHとLHには抗酸化性が認められ、強い抗酸化性を示したPHHを逆向きに配列したHHPの抗酸化力は弱かった。(e)ヒスチジンの代わりにチロシンを導入したペプチドはヒスチジン含有ペプチドより弱い抗酸化力しか示さなかった。最も強い抗酸化力を示したPHHの2残基目のヒスチジンをD型にしたPDHHは弱い抗酸化力しか示さなかった。以上の結果から、LLPHHの抗酸化性発現には2残基のヒスチジンがもつイミダゾール基の適正な配置が必要であることが示された。

## 第三節 ペプチドに対する非ペプチド性抗酸化剤の相乗効果

$40 \mu\text{M}$ のペプチド、 $100 \mu\text{M}$ のフリーラジカル捕捉型合成抗酸化剤BHA、BHTあるいは $10 \mu\text{M}$ の天然抗酸化剤 $\delta$ -トコフェロールを用いて、それぞれ単独の場合と共存させたときの相乗効果を調べた。Table 2に示したように、LPHHを除き、ペプチドと非ペプチド性抗酸化剤には相乗効果がみられ、その効果は $\text{BHA} > \delta\text{-トコフェロール} > \text{BHT}$ の順であった。ペプチド単独で強い抗酸化性を示したLLPHH、HLH、LLPHHH、LHH、PHHの相乗効果は、抗酸化性の弱いペプチドと同程度であり、HPLL、HHLPL、HLのように単独では抗酸化性をもたないペプチドは大きな相乗効果を示した。

大豆タンパク質 $\beta$ -コングリシニン、グリシニン及び塩基性7SグロブリンのプロテアーゼS分解物にも、それら単独では抗酸化性がみられない濃度範囲において、BHA、BHTおよび $\delta$ -トコフェロールとの間で大きな相乗効果が観察された(Figure 9)。したがって、低濃度では弱い抗酸化性しか示さないタンパク質群

素分解物でも非ペプチド性抗酸化剤との併用によって強い抗酸化作用を引き出すことが可能であると考えられる。

#### 第四節 ラジカル開始剤による誘導酸化におけるペプチドの抗酸化性

ペプチドの抗酸化性は、エマルジョン系における水溶性ラジカル開始剤2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)の誘導酸化でも確認を試みた。誘導酸化における抗酸化性は、溶存酸素の低下を酸素電極で測定することによって調べた。Table 3には、均一溶液系においてロダン鉄法で測定したペプチドの抗酸化性とAAPHの誘導酸化を酸素電極で測定した結果をまとめたが、両者には相関性がみられた。一方、脂溶性ラジカル開始剤2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN)による誘導酸化をガスクロマトグラフィーで測定する方法では、均一溶液系で強い抗酸化性を示したペプチドPHHとHLHには活性がみられなかった(Figure 10)。この理由としては、AAPHによって生成したラジカルを水溶液系ではペプチドは速やかに受け取ることができるためリノール酸を酸化から保護できるのに対し、脂溶性ラジカルは直接リノール酸を攻撃するので、ペプチドはリノール酸を保護することができないためと考えられた。

#### 第五節 ペプチドの抗酸化作用機構

ペプチドの抗酸化作用機構には、酸化の原因となるフリーラジカルの消去やキレート作用による微量金属の除去などが考えられる。そこで合成ペプチドの金属とのキレート力やラジカル捕捉効果を調べ、抗酸化ペプチドの作用機構の解析を試みた。金属イオンに対するペプチドのキレート力は、金属イオンを負荷したキレートカラムを装着したHPLCの保持時間によって測定した。銅イオンおよび亜鉛イオンのキレートカラムから求めたペプチドのキレート力と抗酸化力には相関性はみられなかった(Table 4)。

次にペプチドのスーパーオキシド、一重項酸素および安定なフリーラジカルである1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)の捕捉効果を調べた(Table 5)。ペプチドにはスーパーオキシドの捕捉効果はみられなかった。しかし、ペプチドにはフリーラジカルや一重項酸素の捕捉効果が弱いながらも観察され、抗酸化性が強いほどペプチドのフリーラジカルと一重項酸素の捕捉効果が強いという傾向が認められた。

これらの実験結果から、抗酸化ペプチドが金属イオンとのキレート形成作用やフリーラジカル捕捉作用をもつことは明らかではあるが、これら個々の作用の強さと抗酸化力には相関性が見出されず、ペプチドがもつ複数の作用が協同して抗酸化作用を発現していることが示唆された。そこでリノール酸の自動酸化によって引き起こされる抗酸化ペプチドの修飾を調べるため、LLPHHを抗酸化測定の際に用いるリノール酸自動酸化条件で処理し、ロダン鉄法での500 nmの吸光度が0.3を超えた測定液を逆相分配系HPLCで分析した(Figure 11)。リノール酸の酸化に伴い、LLPHHのピーク前後にいくつかのピークが生成していることが観察された。そのうち主要なピークを分取、アミノ酸分析とエレクトロスプレー質量分析を行った結果、このペプチドはヒドロキシラジカルで修飾されていると推定された。酸化に伴って修飾を受けたペプチド量は添加ペプチド量の約15%であり、このことから抗酸化ペプチドのラジカル消去作用は作用機構の一部に過ぎないことが示された。

### 第三章 オカラ煮熟物の抗酸化性

#### 第一節 オカラの煮熟による抗酸化物質の生成

脱脂大豆粉から $\beta$ -コングリシニンとグリシニンを抽出した残さ(オカラ)を、蒸留水および1N硫酸に懸濁させ100℃で4日間処理した。処理後、硫酸は水酸化バリウムで中和、両者の抗酸化力を比較した(Figure 12)。加熱に伴い抗酸化力の増加がみられたが、酸処理物では2日目以降、その増加が停止した。一方、水では抗酸化力の増加が継続した。同様の実験を飽和水酸化バリウム水溶液でも試みたが、酸処理と同じ傾向がみられた。そこで以降の実験ではオカラの熱水懸濁液を用いて抗酸化物質の産生と特性を検討した。

水で十分洗浄してフィチン酸などの水溶性成分を除いたオカラを蒸留水に懸濁し、12日間加熱煮沸処理した。経時的に試料を取り出し、遠心操作で不溶物を除去後、凍結乾燥した。オカラ煮熟物のタンパク質、糖質およびフェノール化合物含量、ならびに処理液のpH変化を Figure 13 に示した。タンパク質含量は2日目に僅かに低下、その後漸増し12日目には煮熟物の38%に達した。これとは逆に、糖質含量は2日目に最大44%になり、その後徐々に低下し12日目には39%になった。また、フェノール化合物含量にも増加がみられ、加熱時間の増加に伴いpHが低下したことから、酸性物質の産生が示唆された。

均一溶液系におけるリノール酸の酸化に対するオカラ煮熟物の抗酸化性をログデン鉄法で測定した。煮熟物の抗酸化性は処理日数の増加に伴って強まり、抗酸化力には濃度依存性があった(Figure 14)。このとき煮熟物の抗酸化力の増加とフェノール化合物含量には相関性が観察された。オカラ煮熟物には褐変もみられた。そこで抗酸化性とメラノイジンの関係を調べるために、12日目の試料を Sephadex G-25 によるゲル濾過クロマトグラフィーで分画、各フラクションの280 nmと470 nmの吸光度、フェノール含量および抗酸化力を測定した(Figure 15)。抗酸化性はフラクション全体にわたって観察され、とくに分子量1500付近に強い抗酸化性が検出された。470 nmの吸光度で示した褐変物質の2つの主ピークにも抗酸化性が検出されたが、明確な対応はなかった。また分画前には、煮熟物に含まれるフェノール化合物含量と抗酸化性に相関が示されたが、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画したフラクションでは抗酸化性とフェノール含量には対応がみられなかった。これらの結果から、オカラの煮熟物の抗酸化性は複数の生成物に起因していることが明らかになった。

#### 第二節 オカラ煮熟物の抗酸化作用機構

前節でオカラ煮熟物の抗酸化性が複数の成分によって発現していることを示したが、次にこれらの物質の特性に関する知見を作用機構から検討した。均一溶液系で最も強い抗酸化性を示した12日目の煮熟物の抗酸化性を、脂溶性ラジカル開始剤AMVNによる誘導酸化系で調べたところ活性がみられなかった(Figure 16)。そこで100 $\mu$ MのBHA、BHTとクエン酸、10 $\mu$ Mの $\delta$ -トコフェロールおよび500 $\mu$ gのオカラ煮熟物を用いて抗酸化性の相乗効果を調べた結果、オカラ煮熟物に対してBHA、BHTおよびトコフェロールには相乗効果がみられたが、クエン酸には相乗効果が観察されなかった(Figure 17)。このことはオカラ煮熟物の抗酸化性が、クエン酸と同じ金属イオンとのキレート作用によっても発現していることを示唆している。

オカラ煮熟物に他の抗酸化機構が存在するか否かを明らかにするために、次にラジカル捕捉効果を調べた。キサンチンとキサンチンオキシダーゼの酵素系およびphenazine methosulfate(PMS)-NADHの非酵素系で生じたスーパーオキシドの捕捉効果を調べた結果をFigure 18に示した。両方の測定系においてオカラ煮熟物は濃度依存的な捕捉効果を示し、その強さは処理時間に対応していた。さらに煮熟物のDPPHフリーラジカルの捕捉効果を調べたところ、処理時間に対応した効果の増強と効果の濃度依存性がみられた(Figure 19)。以上の結果から、オカラ煮熟物のリノール酸の酸化に対する抗酸化効果は、フリーラジカルと活性酸素の捕捉特性および金属イオンとのキレート作用など複合的な機構に因ることが明らかになった。

## 総括

本研究では、食品タンパク質分解物の抗酸化物質としての利用を目指し、大豆タンパク質の酵素分解で生成した抗酸化ペプチドの構造とその作用機構の解明を第1の目的とした。さらに、大豆資源の有効利用の観点から、脱脂大豆粉からタンパク質を抽出した残さであるオカラを熱水処理することによって生成した抗酸化物質の特性の検討を第2の目的にした。

大豆タンパク質の種類、タンパク質分解酵素および分解条件をいろいろ変えて調製した分解物中にリノール酸の自動酸化に対する抗酸化ペプチドを検索した結果、 $\beta$ -コングリシニンのプロテアーゼS分解物から抗酸化性をもつ6種類のペプチドを単離し、構造を決定した。これらのペプチドの中、ペンタペプチドLeu-Leu-Pro-His-Hisをモデルとして類似構造をもつ28種のペプチドを固相法により化学合成し、それらの構造と抗酸化性の相関及び作用機構を検討した。その結果、ペプチドの抗酸化性には構成アミノ酸の種類だけでなく、アミノ酸配列が重要な要素であることが明らかになった。これまでのところPro-His-Hisに最も強い抗酸化性が見出されているが、抗酸化ペプチドの作用機構は単純なものではなく、金属イオンとのキレート形成、一重項酸素やラジカル消去作用など、多くの作用が協同していると結論できる。

合成ペプチドの抗酸化性と非ペプチド性抗酸化剤との相乗効果を系統的に調べた結果、抗酸化性が弱いペプチドに大きな相乗効果がみられた。事実、数種の大豆タンパク質の酵素分解物で相乗効果を検討したところ、分解物単独では抗酸化性がない濃度であっても、非ペプチド性抗酸化剤を併用することによって大きな抗酸化力を得ることができた。この知見は、食品タンパク質分解物を抗酸化剤として使う場合には有用であろう。

大豆タンパク質分解物の抗酸化剤としての利用は、大豆タンパク質の有効利用の一つとして位置付けられるが、大豆製品の一つである豆腐の製造副産物であるオカラの有効利用も生物資源利用の点から重要な課題である。本研究では、オカラの蒸留水懸濁液を加熱処理することによって強い抗酸化性をもった物質が産生することを見出した。このオカラの煮熟物は加熱時間の増加に伴ってフェノール含量が高くなり、抗酸化力を増した。抗酸化作用の機構を検討した結果、オカラの煮熟物も抗酸化ペプチドと同様、金属イオンとのキレート形成作用、フリーラジカルおよびスーパーオキシドの捕捉効果など複合的な要素によって抗酸化性を発揮していると結論された。

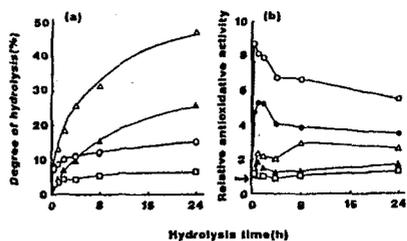


Figure 1. Time courses of hydrolysis and antioxidative activity of  $\beta$ -conglycinin treated with five different protease.  $\square$ :protease M,  $\Delta$ :protease M,  $\bullet$ :protease N,  $\blacktriangle$ :protease P,  $\circ$ :protease S.

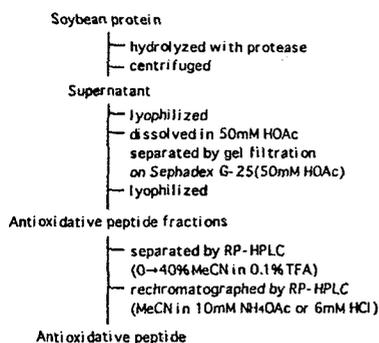


Figure 2 Purification of Antioxidative peptide from Soybean Protein

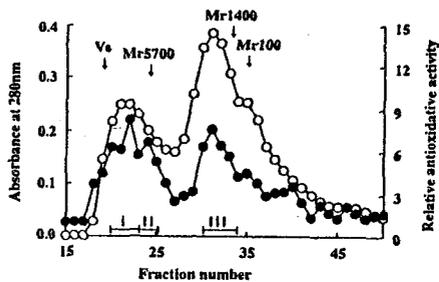


Figure 3. Elution profile of  $\beta$ -conglycinin protease S hydrolysate separated by size exclusion chromatography on Sephadex G-25.  $\circ$ :absorbance at 280nm,  $\bullet$ :relative antioxidative activity.

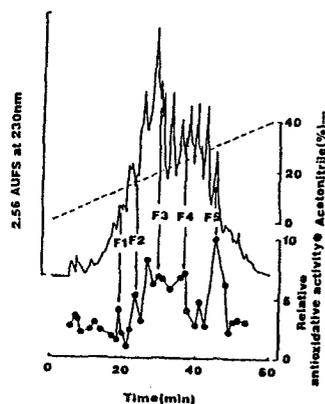


Figure 4. Elution profile and antioxidative activity of fraction III separated by reversed-phase HPLC.

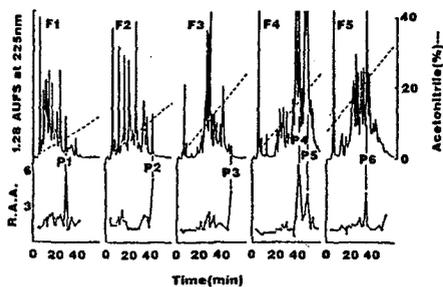


Figure 5. Elution profile and antioxidative activity of F1, F2, F3, F4 and F5 separated by reversed-phase HPLC.  $\bullet$ :antioxidative activity.

Table 1 Amino acid sequences of isolated antioxidative peptides derived from the hydrolysis of  $\beta$ -conglycinin with protease S

P1	Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn
P2	Leu-Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn
P3	Leu-Leu-Pro-His-His
P4	Leu-Leu-Pro-His-His-Ala-Asp-Ala-Asp-Tyr
P5	Val-Ile-Pro-Ala-Gly-Tyr-Pro
P6	Leu-Gln-Ser-Gly-Asp-Ala-Leu-Arg-Val-Pro-Ser-Gly-Thr-Thr-Tyr-Tyr

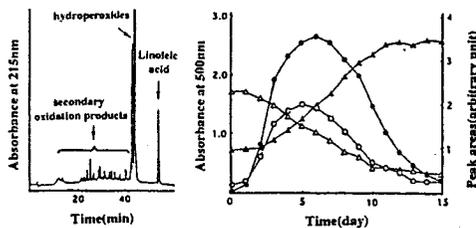


Figure 6. Autoxidation of linoleic acid monitored by the ferric thiocyanate method and by the HPLC method.  
 ●: absorbance, △: linoleic acid, ○: hydroperoxides, ▲: secondary oxidation products.

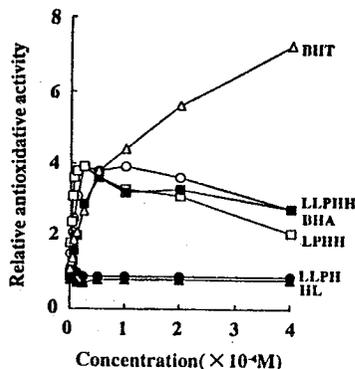


Figure 7. Antioxidative activities of synthetic peptides and nonpeptidic antioxidants.

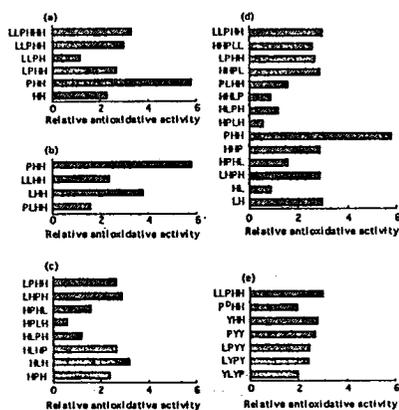


Figure 8. Antioxidative activities of LLPHI and its related peptides. 40 μM of each peptide was used to measure antioxidative activity.

Table 2 Synergistic effects of synthetic peptides on the antioxidative activity of nonpeptidic antioxidants

Peptide	+BHA	+BHT	+Tocopherol
Control	1.0		
BHA		2.4	
BHT			1.9
Tocopherol			
			1.3
HPLH	0.6	13.1(4.4)	5.7(2.3)
HPLP	0.9	16.1(4.9)	5.7(2.0)
HL	0.9	7.4(2.2)	3.2(1.1)
HLPH	1.2	9.3(2.6)	3.4(1.1)
LLPH	1.2	2.5(0.7)	1.4(0.5)
PLHH	1.6	10.3(2.6)	6.9(2.0)
HPHL	1.6	14.3(3.6)	6.2(1.8)
HH	2.3	13.6(2.9)	5.9(1.4)
LLHH	2.4	14.0(2.9)	6.5(1.5)
HHPLL	2.6	14.2(2.8)	5.7(1.3)
HHPL	2.7	11.9(2.3)	4.5(1.0)
LPHH	2.7	11.4(2.2)	6.2(1.3)
HHPL	2.9	14.2(2.7)	6.4(1.3)
LPHL	2.9	15.0(2.8)	6.3(1.3)
LH	3.0	12.1(2.2)	6.1(1.2)
LLPHH	3.0	9.3(1.7)	4.8(1.0)
HLH	3.2	14.0(2.5)	4.3(0.8)
LLPHHH	3.3	12.4(2.2)	5.8(1.1)
LHH	3.8	14.0(2.3)	6.3(1.1)
PHH	5.8	16.4(2.0)	6.6(0.9)

Antioxidative activity was evaluated using the ferric thiocyanate method. The assay was performed with 40 μM of peptides, 100 μM of BHA and BHT, and 10 μM of tocopherol. The number in parentheses is the magnitude of synergistic effect: (Activity of peptide + antioxidant)/(Activity of peptide) × (Activity of antioxidant). Data represent the mean of three replications.

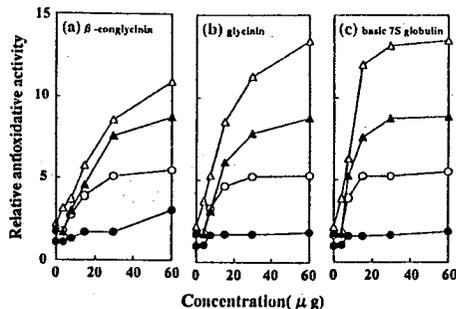


Figure 9. Synergistic effects of soybean protein hydrolysates with nonpeptidic antioxidants.  
 ●: hydrolysate, △: hydrolysate+BHA, ○: hydrolysate+BHT, ▲: hydrolysate+tocopherol.

Table 3 Comparison of the antioxidative activity of synthetic peptides between in an aqueous system and in an AAPH-induced oxidation system

Peptide	Relative antioxidative activity Aqueous system	Relative antioxidative activity AAPH-induced oxidation system
HPLH	0.6	0.98
HPLP	0.9	0.97
HL	0.9	0.98
HLPH	1.2	---
LLPH	1.2	0.94
PLHH	1.6	1.03
HPHL	1.6	0.97
HH	2.3	1.10
LLHH	2.4	1.02
HHPLL	2.4	1.03
HHPL	2.6	1.15
LPHH	2.7	1.14
LPHL	2.7	1.10
HHPL	2.9	1.07
LPHI	2.9	1.12
HHP	2.9	1.06
LH	3.0	1.10
LLPHH	3.0	1.08
HLH	3.2	1.21
LLPHHH	3.3	1.13
LHH	3.8	1.08
PHH	5.8	1.30

The antioxidative activity in an AAPH-induced oxidation system was measured with 33 μM of each peptide. AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropane dihydrochloride)

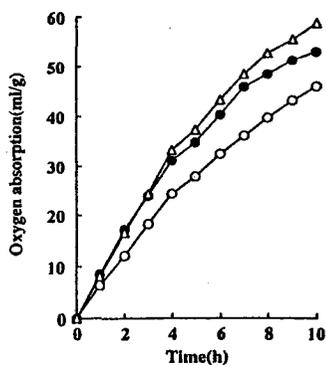


Figure 10. Oxygen absorption in an AMVN-induced oxidation system in the presence of 50  $\mu$ M of peptide. AMVN: 3,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile).  $\circ$ : Control,  $\bullet$ : PHH,  $\blacktriangle$ : LPHH,  $\triangle$ : LPHHH.

Table 4 Relationship between metal ion chelating activity and antioxidative activity of synthetic peptides

Peptide	Relative antioxidative activity	Retention time(min)	
		Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
HPLH	0.6	28.6	7.0
HMLP	0.9	27.2	13.0
HL	0.9	13.1	3.2
HLPH	1.2	26.9	11.2
LLPH	1.2	4.5	2.5
PLPH	1.6	24.6	15.0
HPHL	1.6	27.8	19.0
HH	2.3	27.6	17.0
NPH	2.4	28.0	12.0
LLHH	2.4	24.9	14.2
HHPLL	2.6	29.0	15.2
HLHP	2.7	36.2	10.8
LPHH	2.7	25.2	16.9
HHP	2.9	29.3	16.2
LPHH	2.9	23.6	8.2
HHP	2.9	28.0	13.6
LH	3.0	4.9	3.1
LLPHH	3.0	24.2	14.4
HLH	3.2	28.2	13.0
LLPHHH	3.3	29.3	41.5
LHH	3.8	26.1	11.0
PHH	5.8	26.2	6.9

Table 5 Relationship between radical scavenging effect and antioxidative activity of synthetic peptides

Peptide	Relative antioxidative activity	Radical scavenging effect		
		DPPH <sup>•</sup>	OH <sup>•</sup>	1O <sub>2</sub> <sup>•</sup>
Control	1.0	0.65	0.38	0.45
HPLH	0.6	0.62	0.34	0.35
HMLP	0.9	0.63	0.35	0.35
HL	0.9	0.65	0.34	0.35
HLPH	1.2	0.62	0.36	0.35
LLPH	1.2	0.65	0.35	0.45
PLPH	1.6	0.62	0.36	0.38
HPHL	1.6	0.63	0.35	0.41
HH	2.3	0.62	0.35	0.36
NPH	2.4	0.63	0.37	0.39
LLHH	2.4	0.62	0.36	0.41
HHPLL	2.6	0.63	0.34	0.37
HLHP	2.7	0.63	0.36	0.36
LPHH	2.7	0.65	0.36	0.43
HHP	2.9	0.63	0.35	0.37
LPHH	2.9	0.63	0.37	0.39
HHP	2.9	0.65	0.33	0.43
LH	3.0	0.64	0.35	0.44
LLPHH	3.0	0.65	0.34	0.40
HLH	3.2	0.62	0.37	0.33
LLPHHH	3.3	0.66	0.35	0.40
LHH	3.8	0.62	0.36	0.34
PHH	5.8	0.63	0.37	0.34
LPHH(100 $\mu$ M)		0.65		
LPHH(150 $\mu$ M)		0.65		
LPHH(200 $\mu$ M)		0.65		
Tocopherol(50 $\mu$ M)		0.44(32%)		
Tocopherol(100 $\mu$ M)		0.24(62%)		
Tocopherol(150 $\mu$ M)		0.06(8%)		
Tocopherol(200 $\mu$ M)		0.85(92%)		
Tocopherol(250 $\mu$ M)		0.65(92%)		

Peptide concentration were 50 $\mu$ M for a), 33 $\mu$ M for b) and 40 $\mu$ M for c).

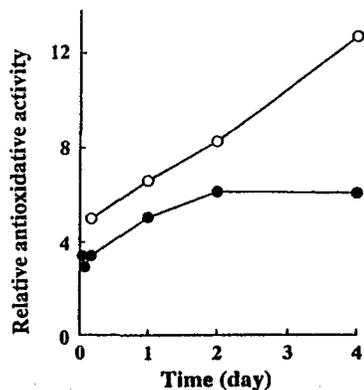


Figure 12. Antioxidative activity of okara boiled in water( $\circ$ ) and in 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>( $\bullet$ ).

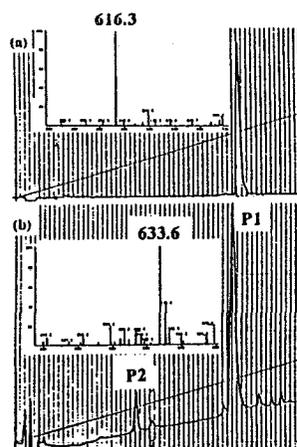


Figure 11. Reversed-phase HPLC of LPHH after incubating in an aqueous ethanol solution containing linoleic acid.

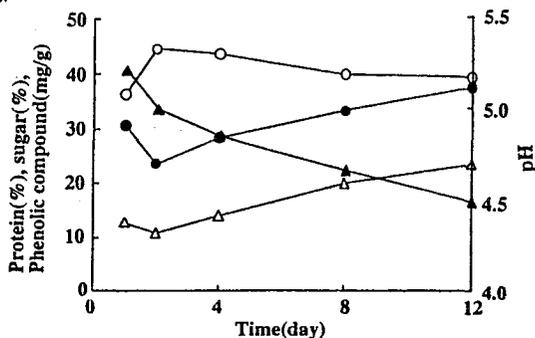


Figure 13. Change in sugar( $\circ$ ), protein( $\bullet$ ) and phenolic compound( $\Delta$ ) contents, and pH( $\blacktriangle$ ) in the okara product during heating at 100°C in water.

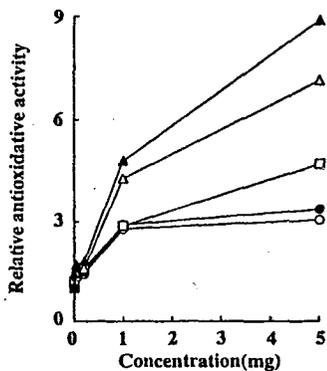


Figure 14. Antioxidative activity of okara product. The products were obtained after boiling for indicated periods. ○:1day, ●:2day, □:4day, △:8day, ▲:12day.

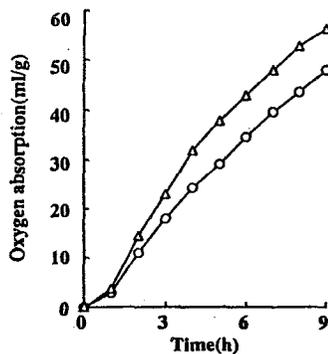


Figure 16. Antioxidative activity of okara product in AMVN-induced oxidation system. ○:Control, △:okara product.

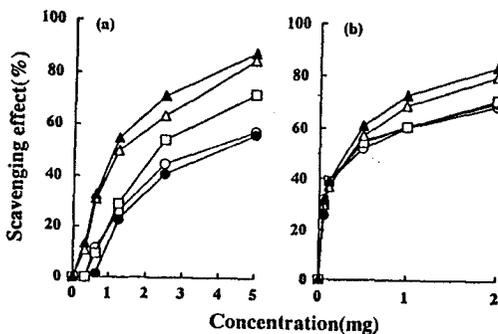


Figure 18. Scavenging effect of okara product on superoxide. (a): Enzymic system, (b): Non-enzymic system. Boiling time: ○, 1day; ●, 2day; □, 4day; △, 8day; ▲, 12day.

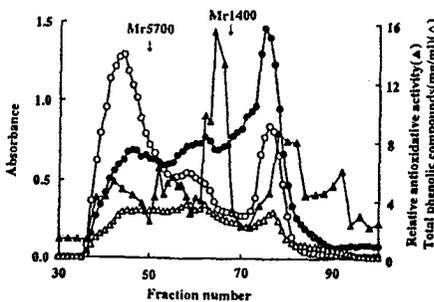


Figure 15. Elution profile of okara product separated by Sephadex G-25 gel filtration chromatography. Okara was treated in boiling water for 12 days. Fractions of 9 ml each were collected. ▲:relative antioxidative activity, △:total phenolic compounds, ○: absorbance at 470nm, ●:absorbance at 280nm.

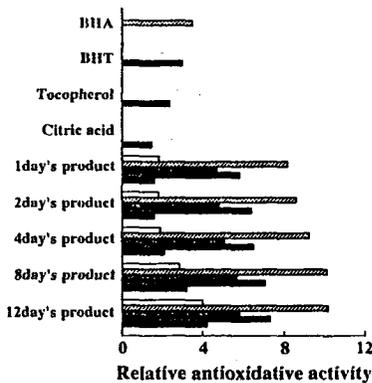


Figure 17. Synergistic effect of okara product on antioxidative activity of antioxidants. The synergistic effect was measured with 500  $\mu$ g of product, 100  $\mu$ M of BHA, BHT and citric acid, and 10  $\mu$ M of  $\delta$ -tocopherol.

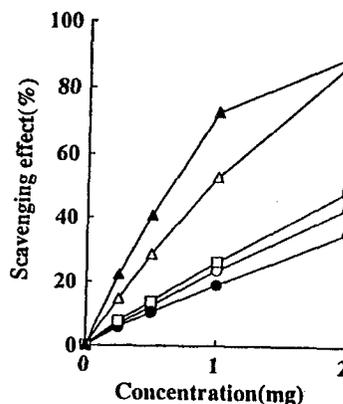


Figure 19. Scavenging effect of okara product on DPPH radical. Boiling time: ○, 1day; ●, 2day; □, 4day; △, 8day; ▲, 12day.

## 論文審査の要旨

不飽和脂肪酸の酸化によって生じる過酸化物質やフリーラジカルは、食品の風味や栄養価を損ない、品質の劣化を引き起こすだけでなく、生体においては疾病や老化などに悪影響を及ぼすと云われており、安全で効果的な抗酸化剤の開発が各方面で望まれている。本研究は、大豆資源の有効利用を目指し、大豆タンパク質の酵素分解で生成した抗酸化ペプチドの構造とその作用機構の解明、及びオカラ煮熟物の抗酸化特性の解明を目的として行われた。

まず大豆タンパク質の酵素分解物を種々の条件で調製し、リノール酸の自動酸化に対する抗酸化ペプチドを検索、6種類の抗酸化ペプチドを単離し、構造を決定した。次に、これらのペプチドの中からLeu-Leu-Pro-His-Hisをモデルとして選び、類似構造をもつ28種類のペプチドを固相法で化学合成し、それらの構造と抗酸化性の相関を調べた。その結果、Pro-His-Hisに最も強い抗酸化性を見出すと共に、抗酸化性の発現に関わるヒスチジン残基に求められる構造的要因を明らかにした。また、抗酸化ペプチドの作用機構を検討し、金属イオンとのキレート形成、一重項酸素やラジカル消去作用など、ペプチドがもつ複数の機能が協同して抗酸化性を発現していることを示した。

次に、合成ペプチドの抗酸化性と非ペプチド性抗酸化剤との相乗効果を系統的に調べ、抗酸化力と相乗効果作用には直接的な相関がないことを明らかにした。大豆タンパク質の酵素分解物に強い相乗効果があることも見出ししており、これらはタンパク質分解物と抗酸化剤を併用する場合の有用な知見である。

大豆から豆腐を製造するときの副産物であるオカラの有効利用は、生物資源利用の点から重要な課題である。本研究ではオカラの水懸濁液を煮熟すると抗酸化物質が産出することを見出した。煮熟物をゲル濾過クロマトグラフィーで分画後、各画分の抗酸化力とメラノイジン、糖、タンパク質及びフェノール化合物含量との関連を調べ、これらのいずれとも直接的な関わりがないことを示した。さらに抗酸化作用の機構を検討した結果、オカラの煮熟物も抗酸化ペプチドと同様、金属イオンとのキレート形成作用、フリーラジカル及びスーパーオキシドの捕捉効果など、複合的な要素によって抗酸化性を発揮していると結論した。

以上のように、本論文は大豆のタンパク質分解物とオカラの煮熟物に見出した抗酸化物質の化学的特性の解析と作用機構の詳細な検討から多くの新知見を得ており、食品タンパク質化学と未利用資源の有効利用に寄与するところ大である。よって、博士（農学）の学位を授与するに値すると判定した。