

SPI から調製したペプチド混合物の脱塩精製と精製標品の腸管吸収

DEMINERALIZATION OF ENZYMIC HYDROLYSATE OF SPI (HINUTE PM) AND ABSORPTION OF DESALTED PREPARATION IN RAT SMALL INTESTINE *IN VITRO*

中坊幸弘・宇都宮玲子・鈴木健史・渡邊美幸・萩平 博(徳島大学医学部)

松尾高明・木本 実・大島芳枝(不二製油㈱)

Yukihiro NAKABOU¹, Reiko UTSUNOMIYA¹, Takeshi SUZUKI¹, Miyuki WATANABE¹, Hiroshi HAGIHIRA¹, Takaharu MATSUO², Minoru KIMOTO² and Yoshie OHSHIMA²

¹Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770

²Fuji Oil Co., Ltd., Izumisano 598

ABSTRACT

Cation-exchange resin chromatography using Amberlite IR 120B was performed to remove ashes contained in Hinute PM. Concentrations of minerals were reduced from 6.2 % in the crude preparation to 2.4% in the refined preparation and contaminated sugars were also reduced from 4.4% to 0.9% by the treatment. HPLC profile of the refined preparation showed a decrease in percentage of peptides with high molecular weight and an increase in percentage of peptides with low molecular weight, indicating that large peptides in the crude preparation were partially removed by the chromatography. Since in concomitant with removal of some large peptides, concentrations of free amino acids increased from 19.5% in the crude preparation to 33.3% in the refined preparation, mean chain length of amino acid residues decreased from 2.9 to 2.1. The rates of absorption of amino acids from crude Hinute PM, refined Hinute PM and an amino acid mixture simulating crude Hinute PM were observed by the everted sac method in the rat jejunum and ileum. Total amount of amino acids absorbed from three substrates in the jejunum was the following order : an amino acid mixture simulating Hinute PM>refined Hinute PM>crude Hinute PM and in the ileum : refined Hinute PM>an amino acid mixture>Hinute PM. Total amount of amino acids absorbed from the refined preparation was 24% more in the jejunum and 51% more in the ileum than that from the crude preparation. The amount of acidic amino acids absorbed from an amino acid mixture was 43-45% of the total non-essential amino acids absorbed, while acidic amino acids were absorbed less than 10% from the both preparations. These results suggest that the refined preparation is more effectively absorbed than the crude preparation and the both preparation contain a considerable amount of oligopeptides with acidic amino acids resistant to hydrolysis with

食品たん白質を酵素で部分加水分解して調製したペプチド混合物の関心が、近年とみに高まっている。それはたん白質やアミノ酸では得られないペプチド特有の物理化学的特性¹⁾に加えて、生理的特性も揃えているからである。また、こうしたことからペプチド混合物を利用した製品も既に開発され市販もされている¹⁾。

ところで、食品ペプチドの製造はたん白質分解酵素を利用して行われ、ペプチド混合物は酵素分解終了後、可溶性画分を回収して調製されているので、糖類や塩類が比較的多く含まれている。

例えば、SPI 由来ペプチド混合物 (Hminute-PM) は窒素成分以外に、約6%の灰分と4%の糖質などを含有している。

そこで本研究では、このペプチド混合物の栄養特性改善の一環として、陽イオン交換樹脂による脱塩精製を行うとともに、精製標品を用いてラットにおける腸管吸収を *in vitro* で比較検討した。

実験方法

ペプチド混合物の脱塩精製

用いたペプチド混合物は不二製油㈱から提供された Hminute-PM で、Table 1 に分析値を示した。陽イオン交換樹脂として Amberlite IR 120 B, カラムの大きさは8×23 cm で、bed volume は500 ml とした。pH 3.0に調整した2%濃度の Hminute-PM 20 g をカラム吸着させ、水洗後、2 N アンモニア水溶液で溶出した。溶出液を減圧乾固し、蒸留水に再溶解して真空凍結乾燥させた。

In vitro 腸管吸収実験

初体重250 g のSD系雄ラット (静動協) を、体重約200 g になるまで市販固型飼料 (オリエンタル酵母㈱, MF) で飼育した。実験前夜は5%果糖溶液のみを与えて絶食させた。

吸収実験は日内変動を考慮して午前10時から午後2時の間に、空腸と回腸の反転小腸法²⁾を用いて行った。

粘膜側のメディウムには各サンプルの濃度 (N×6.25) が2%になるよう Krebs-Ringer phosphate buffer (KRPB pH 7.4) に溶解させたもの5.0 ml を用いた。漿膜側 (サック内) は KRPB のみとして、気相を酸素ガスで置換したのち、20分間、37℃で振盪しながら (70 c/min) インキュベーションした。

インキュベーション終了後、漿膜側液 (サック内液) を酢酸ウランで除たん白³⁾して、アミノ酸自動分析機 (日立835型) でアミノ酸量を測定した。また、粘

膜側のメディウムを KRPB のみとした同様の実験を同時に行って、内因性アミノ酸の漿膜側出現量を求めた。吸収量は内因性アミノ酸の補正を行って $\mu\text{moles/g}$ 湿重量/20 min で表した。

分析

ミネラルは原子吸光分析法で測定した。Hminute-PM と脱塩ペプチド混合物のアミノ酸組成は定法通り分析して求めた。また、両ペプチド混合物の分子量分布を HPLC (東洋ソーダ, CCPM) にて分析した。

結果と考察

Table 1 にペプチド混合物の脱塩処理前後のミネラル分析結果を示した。最も含有量の多い Na は脱塩精製処理でも約50%しか減少せず、Fe も13%の低下にとどまった。しかし、分析した他のミネラルは脱塩処理により殆んど完全に除くことが出来た。

ところで、今回は脱塩を目的とした陽イオン交換樹脂処理であったが、脱塩標品を分析してみると遊離アミノ酸の割合は処理前の20%から33%へと増加していた。そのため、平均ペプチド鎖長も2.9から2.1へと短くなることが判明した。

Fig. 1 に示した HPLC によるゲル濾過の溶出パターンでは高分子側のピークが低くなり低分子側で明らかに高くなっていた。この事実は陽イオン交換樹脂の操作を施すことによって高分子ペプチド画分が除去

Table 1. Analysis of oligopeptide mixtures

	Hminute-PM Desalted	
Content of free amino acids (%)	19.5	33.3
Chain length of amino acid residues	2.9	2.1
Composition (g/100 g dry wt)		
Protein	89.4	96.7
Ash	6.2	2.4
Others	4.4	0.9
Mineral composition (mg%)		
Na	1860	921
P	860	14
K	372	9
Mg	96.7	1.4
Ca	76.3	11.6
Fe	5.58	4.85
Zn	4.47	n. d.*
Cu	2.14	n. d.*

* n. d. : not detected

されたことを意味し、脱塩精製されたペプチド混合物はより低分子のペプチド混合物になったものと思われる。

また、糖その他の成分も脱塩前の Hinute-PM に比べて1/3以下に減少していた。

両ペプチド混合物を定法により塩酸加水分解して求めたアミノ酸組成の分析値を Fig. 2 に示した。図では必須アミノ酸と非必須アミノ酸に分け含有量の多い順に配列した。

Hinute-PM に比べて減少したアミノ酸は Glu, Pro, Asp, Gly で、特に前2者で大きく減少した。それ以外のアミノ酸は何れもその分増加しており、Leu の増加が目立った。しかし、Glu を除いて脱塩前のアミノ酸パターンに類似しているように思われる。

Glu や Pro などのアミノ酸は、一般に酵素分解され難いペプチドを構成することが知られており、Hinute-PM 中でも比較的高分子のペプチドとして存在していたため水洗い段階で除去されたのではないかと想像される。

両ペプチド混合物および Hinute-PM と同一組成のアミノ酸を用いて、吸収速度(量)を反転小腸法で比較検討した結果を Figs. 3, 4 に示した。

空腸 (Fig. 3) のアミノ酸混合物からの吸収速度の速いアミノ酸は Glu+Gln (Glx), Asp+Asn (Asx), Gly, Pro, など、先に記したように、何れもプロテアーゼやペプチダーゼに抵抗性を示すペプチドを構成するアミノ酸である。従って、Hinute-PM 中ではこれらのアミノ酸がジペプチドやトリペプチドとしてで

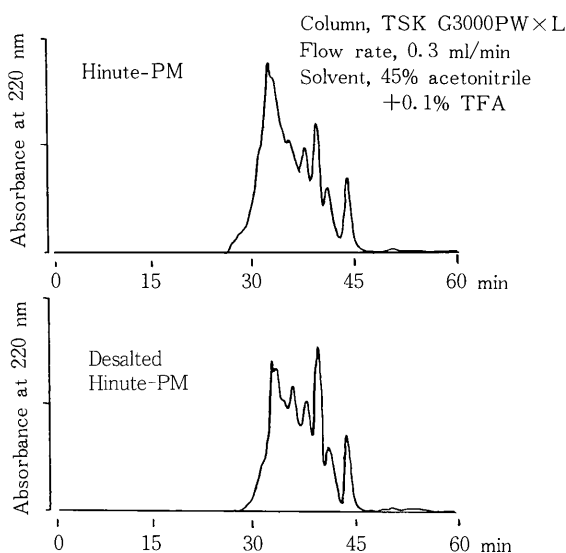


Fig. 1. Chromatographic profiles of peptides by HPLC.

はなく比較的大きなペプチドとして存在していたために吸収され難かったものと考えられる。

両ペプチド混合物間の比較では、脱塩精製サンプルからの方がどのアミノ酸についてももとの Hinute-PM からよりも、速く吸収された。なかでも、Leu, Val, Ile は吸収が有意に速く、単位時間当りの吸収量は多くなっていた。

回腸における結果 (Fig. 4) は、空腸の場合と同傾向にあり、個々のアミノ酸吸収の差は空腸で観察されたよりも一層明らかである。

アミノ酸混合物と両ペプチド混合物からのアミノ酸吸収を空腸と回腸で比較すると、アミノ酸混合物からの吸収は両部位で殆ど同じであったが、ペプチド混合物のうち脱塩精製標品では回腸の方が多く吸収されていた。

Fig. 5 にアミノ酸の吸収総量を必須アミノ酸と非必須アミノ酸に分けてまとめた。吸収総量は Hinute-PM からよりもアミノ酸混合物からの方が多くなった。これは主として非必須アミノ酸の吸収量に由来したもので、特に Glx と Asx 吸収量の違いが大きく影響している。必須アミノ酸の吸収総量はペプチド混合物からの方が多くなる傾向が認められた。サンプルの中の Glx と Asx が全体のアミノ酸に占める割合は33% (モル%) で、非アミノ酸の52%にも達する。吸収され

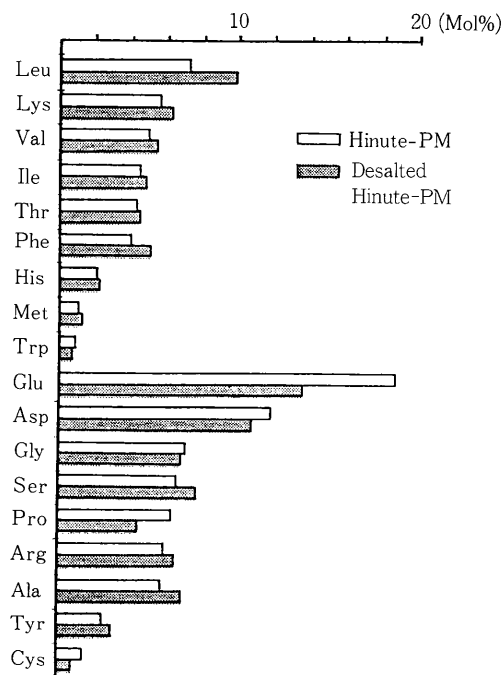


Fig. 2. Amino acid composition of peptides.

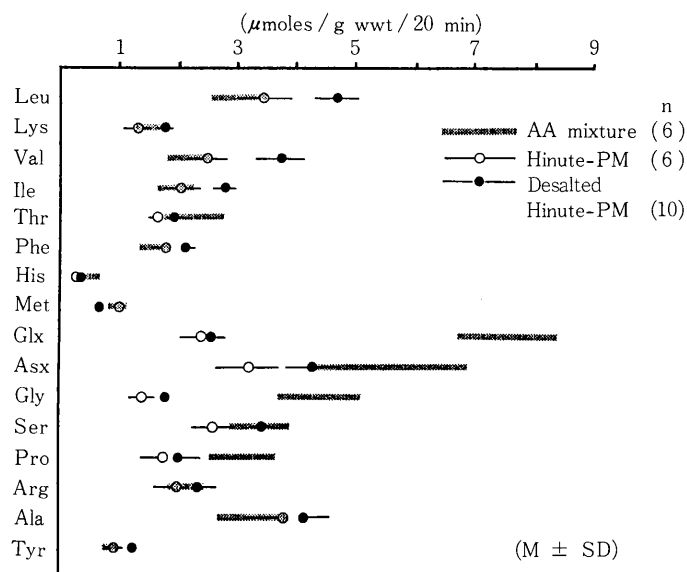


Fig. 3. Amino acid absorption from amino acid mixture and peptides with jejunal everted sacs.

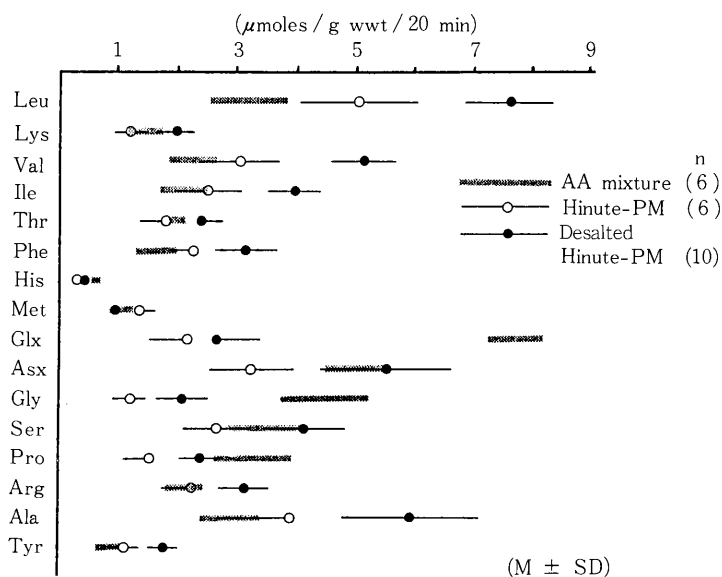


Fig. 4. Amino acid absorption from amino acid mixture and peptides with ileal everted sacs.

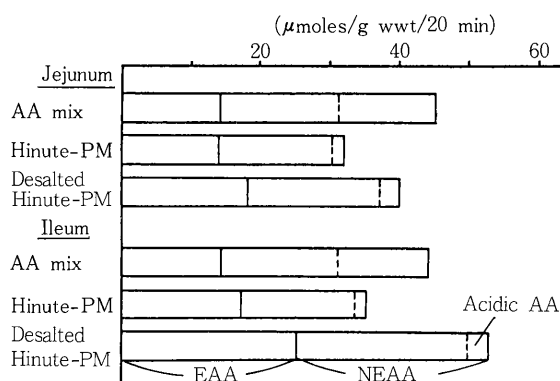


Fig. 5. Amount of total amino acids absorbed from amino acid mixture and peptides by everted sac method.

たアミノ酸を分析した結果、アミノ酸混合物からの場合、空腸では45%、回腸では43%と非必須アミノ酸の半分近くをGlxとAsxが占めた。

これに反して、Hinute-PMからのGlxとAsxの吸収量は約10%であり、ペプチド混合物中ではそれらのアミノ酸が比較的高分子のペプチドを形成している可能性を示唆するものである。

ペプチド混合物どうしの比較では、脱塩した方がアミノ酸吸収総量は多くなっており、空腸は1.24倍、回腸では1.51倍にもなっていた。さらに、回腸ではアミノ酸混合物からの吸収総量をも上回った。

両ペプチド混合物の10%濃度を用いて行った実験結果もまた2%濃度の場合と同様に、脱塩精製標品からの方が明らかにアミノ酸吸収は優れていた。吸収総量の比較でも空腸で1.20倍、回腸で1.37倍多く吸収され、その時の個々のアミノ酸吸収についても、2%濃度の場合と同じ傾向にあった(結果は省略)。

脱塩精製することで *in vitro* におけるアミノ酸腸管吸収が改善された理由として、吸収阻害物質の除去、

脱塩効果、あるいは遊離アミノ酸と低分子ペプチドの割合が改善されたといった可能性が考えられる。

まず、アミノ酸混合物にHinute-PMに含まれるのと同量の各ミネラルを添加して吸収実験を行ったところ、アミノ酸の吸収速度に変化は認められなかった(データは省略)。

このことから、少なくとも脱塩標品の吸収量増大は単なる脱塩によるものではないと考えられる。

本実験では脱塩精製したペプチド混合物の遊離アミノ酸含量が20%から33%に増加したこと、大きなペプチドが除かれて小ペプチド混合物の割合が増加したことなどが吸収量の増大をもたらした原因ではないかと思われる。今後、その点を確認する予定である。

脱塩処理に関して御助言頂いた本学小川 正 助教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 松尾高明 (1988) : 大豆ペプチドの開発と利用—機能特性とその応用用途に関して. 月刊フードケミカル, 8, 64-69.
- 2) Wilson, T. H. and Wiseman, G. (1954) : The use of sacs of everted small intestine for the study of the mucosal to serosal surface. *J. Physiol.*, **123**, 116-125.
- 3) Hara, H., Funabiki, R., Iwata, M. and Yamazaki, K. (1984) : Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J. Nutr.*, **114**, 1122-1129.
- 4) Alpers, D. H., (1986) : Uptake and fate of absorbed amino acids and peptides in the mammalian intestine. *Federation Proc.*, **45**, 2261-2267.
- 5) 萩平 博 (1988) : アミノ酸栄養とペプチド栄養, ペプチド栄養—その吸収と効用—. ペプチド栄養研究会編, 不二製油株式会社, 大阪 pp. 3-19.