

ミネラル代謝に対するフィチン酸除去大豆たん白質酵素分解物の影響

EFFECTS OF PHYTATE REMOVAL FROM SPI HYDROLYZATE ON THE CALCIUM AND ZINC BIOAVAILABILITIES IN THE GROWING RATS

新山喜昭・坂本貞一・岡田和子（徳島大学医学部）
松尾高明・木本 実（不二製油株式会社）

Yoshiaki NIIYAMA¹, Sadaichi SAKAMOTO¹, Kazuko OKADA¹,
Takaharu MATSUO² and Minoru KIMOTO²

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

²Fuji Oil Company, Izumi-Sano 598

ABSTRACT

Effect of phytic acid removal from SPI hydrolyzate on mineral bioavailabilities was examined in weanling rats. For phytate removal, the SPI hydrolyzate solution was adjusted to pH 4.5 with citric acid and then passed through a column packed with ion exchange resin. Accordingly, three diets of SPI-hydrolyzate (designated as SP), SPI-hydrolyzate with citric acid (SCP) and SPI-hydrolyzate without phytate (SC) were tested for mineral bioavailability. Dietary levels (%) of citric acid and phytic acid were 0 and 0.62 in SP, 2.3 and 0.60 in SCP and 1.7 and 0.01 in SC, respectively. Calcium and zinc contents in the three diets were 0.5 g/kg and 35 mg/kg, respectively. After measurements of calcium and zinc balances during final 6 days of 3 week feeding period, mineral contents in tissues (plasma, kidney and femur) were determined. Apparent absorption and retention of dietary calcium were negatively correlated with the amounts of dietary citric acid and phytate, while those of dietary zinc were not influenced by dietary phytate, showing that the phytate-less SPI hydrolyzate was beneficial for calcium utilization. Nephrocalcinosis found in SP group did not appear in SCP and SC groups, indicating citric acid prevented renal calcium accumulation. Effect of dietary citric acid on renal calcium was examined histologically and chemically in rats fed diets containing different protein sources. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **13**, 80-85, 1992.

近年、成分栄養剤その他食品素材として各種たん白質分解物が用いられてきており、分離大豆たん白質(SPI) ペプチドもそうした内の1つである。SPIにはフィチン酸が含まれており、このためカゼインや卵たん白質に比しミネラルの利用が悪いとされているが酵

素分解で得た SPI ペプチドにもフィチン酸がそのまま残存する。一方、クエン酸は広く食品添加物として用いられており、ミネラルの溶解性を高め、吸収を促進するとされている。そこで今回、SPI ペプチドからフィチン酸を除いた場合、あるいはクエン酸を添加した場合のミネラル利用に及ぼす影響をラットを用いて

比較検討した。

実験方法

実験に用いた SPI ペプチドの製造ならびにフィチン酸除去工程と実験に用いた各ペプチド中の窒素、クエン酸及びフィチン酸含量を Fig. 1 に示した。SPI の酵素分解にはアルカリプロテアーゼ (*Bacillus subtilis*) を、フィチン酸除去は陰イオン交換樹脂を用いた。上記方法にて得た 3 種のペプチド (平均ペプチド鎖長 3.3) 各々を実験食のたん白質源とし、たん白質レベルは 20% (等窒素量) とした。各実験食組成と飼料中のミネラル含量 (実測値) を Table 1 に示した。実験食 SP, SCP 及び SC 中のクエン酸含量 (%) は 0, 2.3, 1.7 でフィチン酸含量 (%) は 0.62, 0.60, 0.01 であった。SC 食の P 含量は脱フィチン酸処理の結果他の実験食より低値であった。これら 3 つの実験食のいずれか 1 つを体重約 80 g の SD 系雄ラットに 3 週間、脱イオン水と共に自由摂取させた。最後の 6 日間に出栏実験 (Ca, Zn 及び Fe) を行い、その後採血、屠殺し、各種臓器を摘出した。実験食、便、尿及び組織のミネラル含量は硝酸で湿式灰化したもの (血漿は塩酸溶液で希釈) を原子吸光法により求めた。P 測定はモリブデン酸ブルー法を用いた。

結果と考察

実験食投与期間中の各群の体重の経日変化と出納期

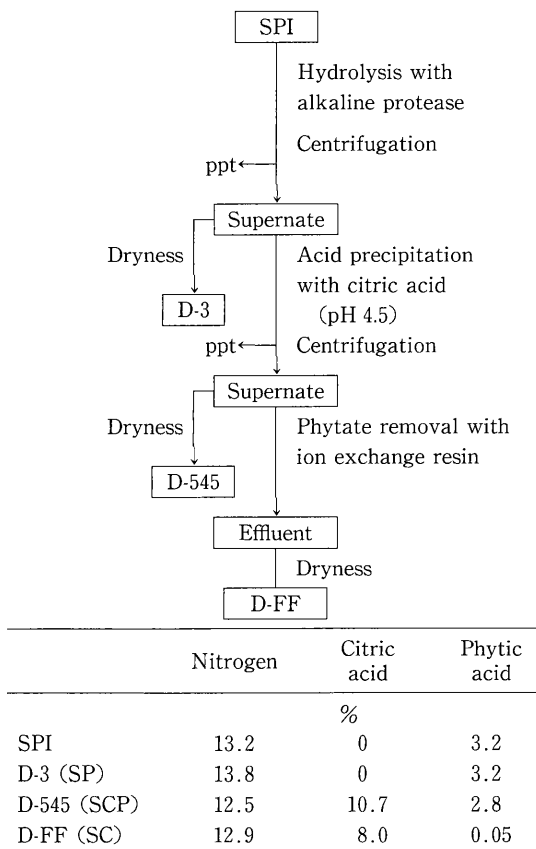


Fig. 1. Process for phytate removal from SPI peptide.

Table 1. Composition of experimental diets and their mineral contents

	SPI	SP	SCP	SC
Components, g/kg				
SPI or its hydrolyzate	202	194	214	207
Corn starch	452	459	444	449
Sucrose	226	227	222	224
Corn oil	50	50	50	50
Cellulose	20	20	20	20
Salt mix. (AIN-76)	35	35	35	35
Vitamin mix. (Harper)	15	15	15	15
Citric acid		0	23	17
Phytic acid		6.2	6.0	0.1
Found, per kg				
N, g	27.0	27.0	26.8	27.3
Ca, g	4.98	4.94	5.08	5.04
P, g	4.83	4.85	4.58	3.70
Mg, g	0.66	0.69	0.71	0.71
Fe, mg	64.0	55.1	60.9	50.8
Zn, mg	38.4	33.7	40.5	34.0
Cu, mg	12.7	12.9	10.7	11.0

間中の摂食量及び体重増加量を Fig. 2 及び Table 2 に示した。実験食投与 2 週目まで SC 群の発育は他 2 群に比し悪く、食餌中のクエン酸含量が関係したのかもしれない。また、出納期間中の摂食量は他 2 群に比しやや低かった、しかし体重増加量には 3 群間に差はなかった。

Ca 出納の結果を Table 3 に示した。SCP 群の Ca 吸収率 (52%) は SP 群 (55%) より低い傾向を示した。一方 SC 群の Ca 吸収率 (58%) は他 2 群より高く、Ca 蓄積量も SCP 群のそれより多く、大腿骨 Ca 濃度はこれを反映して大であった (Table 6)。

Zn 出納の結果を Table 4 に示した。SCP 群の Zn 吸収率 (19%) は SP 群 (22%) より低く、SC 群の Zn 吸収率 (20%) は脱フィチン酸処理によりやや改善の傾向がみられたが SCP 群のそれと差はなかった。また、3 群の Zn 蓄積量や血漿及び大腿骨 Zn 濃度にも差はなかった。次に Ca, Zn 及び Fe (データは示していない) の吸収率と蓄積量に対する各無機質の摂取量 (mg or $\mu\text{g}/6$ days), クエン酸及びフィチン酸摂取量 (g/6 days) の影響を重回帰分析を行い検討した。Table 5 に各元素の吸収率 (%) と蓄積量 (mg or $\mu\text{g}/6$ days) に対する重回帰式及び各説明変数 (因子) の寄与を示した。その結果、無機質摂取量は各々の無機

質の吸収率に対し影響せず、蓄積量に対し有意 (正) に影響した。クエン酸は各無機質の吸収率と蓄積量 (Zn の吸収率を除く) に有意 (負) に影響した。また、フィチン酸は Ca の吸収率と蓄積量にのみ有意 (負) に影響した。一般にクエン酸はミネラルの溶解性を高めることから吸収が促進されると考えられているが、ク

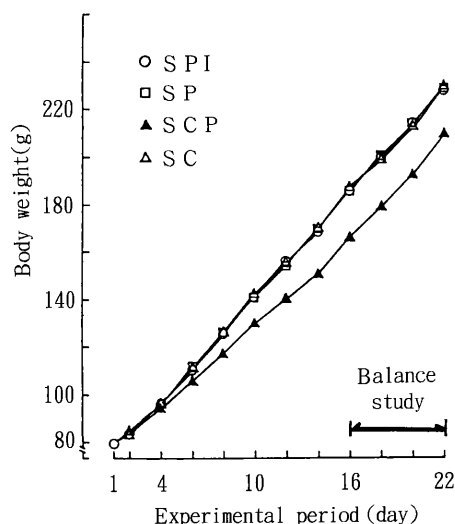


Fig. 2. Changes in body weight.

Table 2. Food intake and body weight gain

	Food intake	Body weight			Weight gain	Food efficiency
		day 1	day 16	day 22		
	<i>g/6 days</i>		<i>g</i>		<i>g/6 days</i>	
SPI	130±11 ¹	79±4	186±14	228±17	42±4	0.33±0.02
SP	127±10	79±4	186±9	229±10	43±5	0.34±0.02
SCP	118±11	79±4	167±12 ^{ab}	210±13 ^{ab}	43±4	0.37±0.03 ^a
SC	126±15	79±4	188±20 ^c	229±26	42±6	0.33±0.02 ^c

¹ Means±SD for seven rats. ^{a,b,c} Significantly different from SPI, SP and SCP groups at 5% level, respectively.

Table 3. Effects of citrate addition to and phytate removal from SPI hydrolyzate on calcium bioavailability

	Intake	Feces	Urine	Balance	Apparent absorption
		<i>mg/6 days</i>			<i>%</i>
SPI	645±56 ¹	312±41	11±4	322±21	52±3
SP	626±51	284±34	10±5	333±24	55±3
SCP	600±58	286±36	14±7	300±22 ^b	52±2
SC	636±74	269±31 ^a	22±16	345±31 ^c	58±1 ^{abc}

¹ Means±SD for seven rats. ^{a,b,c} Significantly different from SPI, SP and SCP groups at 5% level, respectively.

エン酸の Zn や Fe に対する溶解性は Ca より小さいとの報告¹⁾がある。クエン酸存在下での Ca の吸収はクエン酸/Ca のモル比が影響する²⁾とされ、Zn³⁾や Fe⁴⁾の吸収は必ずしもクエン酸添加で促進していない。いずれの場合も各無機質量に対するクエン酸量が多いことが吸収に関係しているようでこの点については今後検討が必要である。フィチン酸がミネラルの吸収を阻

害することは良く知られている。Ca の利用障害⁵⁾、Fe の吸収阻害⁶⁾や Zn 利用に対して (Ca)×(フィチン酸)/(Zn) 比が重要であるとの報告⁷⁾がある。本実験ではフィチン酸除去により Ca の吸収が改善された。しかし Zn や Fe の吸収には脱フィチン酸の効果は見られなかった。これは Ca の吸収が促進されたことにより、Zn や Fe の吸収が抑制されたためかもしれない。

Table 4. Effects of citrate addition to and phytate removal from SPI hydrolyzate on zinc bioavailability

	Intake	Feces	Urine	Balance	Apparent absorption
		$\mu\text{g}/6 \text{ days}$			%
SPI	4977±435 ¹	4067±433	56±16	854±145	18±3
SP	4272±350 ^a	3347±333 ^a	49±10	875±122	22±3
SCP	4781±459 ^b	3898±391 ^b	57±25	826±126	19±3 ^b
SC	4294±500 ^a	3420±404 ^{ac}	47±7	826±109	20±1

¹ Means±SD for seven rats. ^{a,b,c} Significantly different from SPI, SP and SCP groups at 5% level, respectively.

Table 5. Multiple regression analyses

Regression equations	
Ca A=	-0.002 I -1.056 C -6.856 P +61.27
R=	0.424 I -8.705 C -34.93 P +94.29
Zn A=	-1.204 C -1.592 P +22.27
R=	0.191 I -54.21 C -81.66 P +124.0
Fe A=	-2.414 C -2.017 P +32.93
R=	0.276 I -169.7 C -192.3 P +236.4

A : absorption, (%). R : retention (mg or $\mu\text{g}/6 \text{ d}$).
I : mineral intake (mg or $\mu\text{g}/6 \text{ d}$). C : citrate intake (g/6 d). P : phytate intake (g/6 d).

Standard regression coefficients			
	I	C	P
Ca A	-0.04	-0.42 [#]	-0.82 ^{##}
R	+0.82 ^{##}	-0.34 ^{##}	-0.40 ^{##}
Zn A	+0.03	-0.57	-0.22
R	+0.80 ^{##}	-0.57 [#]	-0.25
Fe A	≐0	-0.72 ^{##}	-0.18
R	+0.65 ^{##}	-0.67 ^{##}	-0.23

[#]p<0.05, ^{##}p<0.01.

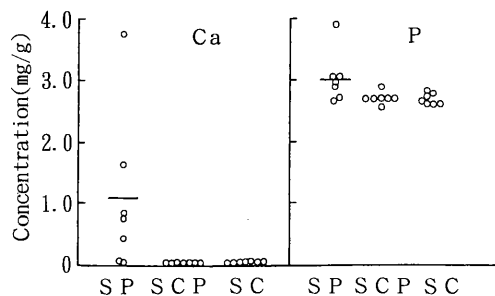


Fig. 3. Calcium and phosphorus concentrations in kidney.

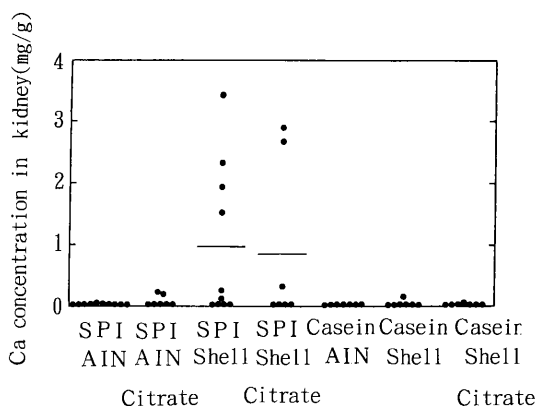


Fig. 4. Nephrocalcinosis in rats fed diets with different protein and calcium sources.

腎臓 Ca と P 濃度を Fig. 3 に示した。SP 群の腎臓 Ca 濃度は 7 例中 5 例が $100 \mu\text{g/g}$ 以上と高値であったが、他 2 群では全例 $60 \mu\text{g/g}$ 以下であった。ラットでは大豆たん白質はカゼインや卵たん白質より nephrocalcinosis をおこしやすい⁹⁾とされており、また腎臓 P 濃度は Ca 濃度とパラレルに推移したので、Ca はリン酸塩の形で存在することを窺わせる。クエン酸添加食を摂取した動物の腎臓 Ca 濃度が低かったことはクエン酸に腎 Ca 蓄積予防効果がある⁹⁾ことを示している。ところで腎臓 Ca 蓄積には多くの食餌性因子が関与するといわれているので飼料成分の内、たん白質を SPI またはカゼインとし、Ca 源をリン酸 Ca と卵殻 Ca、クエン酸を添加したものとししないものの計 7 種の実験食をつくり 3 週間幼若ラットに投与し、腎臓への Ca 蓄積を観察した (Fig. 4)。Ca 源やクエン酸の有無にもよるが SPI 食群の腎臓 Ca 濃度はカゼイン食群に比し高い傾向にあった。Fig. 5 は化学的方法により Ca

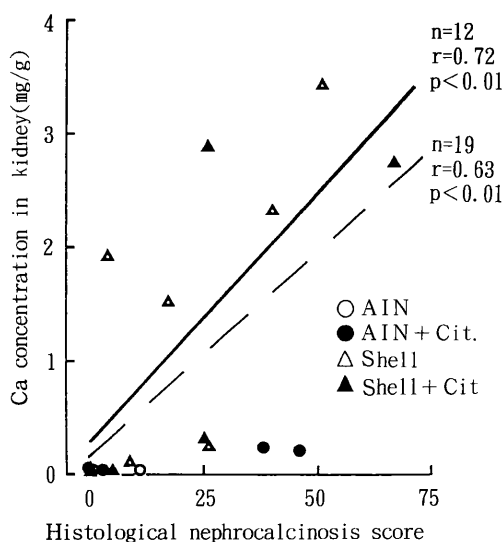


Fig. 5. Relation of renal calcium concentration to histological nephrocalcinosis score.

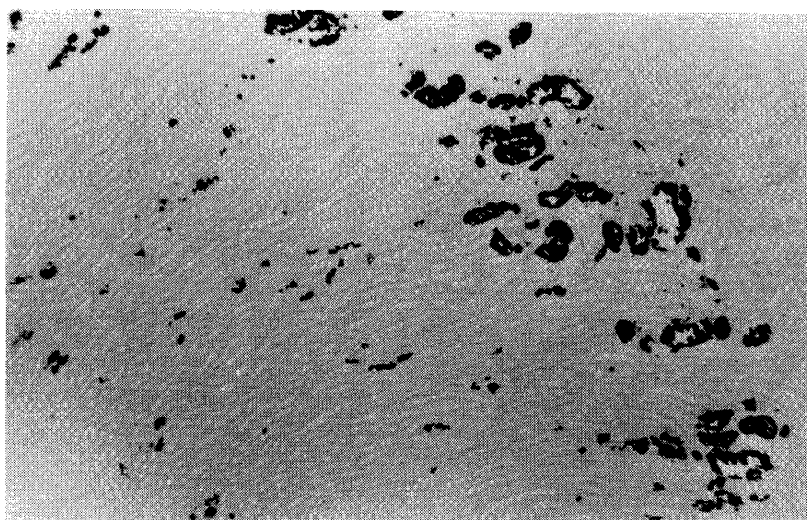


Fig. 6. Longitudinal section of a rat kidney, showing a severe degree of corticomedullary calcification. Silver stained (Kossa's method) section $20\times$.

Table 6. Effects of citrate addition to and phytate removal from SPI hydrolyzate on calcium and zinc concentrations in plasma and femur

	Balance	Ca		Zn		
		Plasma	Femur	Balance	Plasma	Femur
	mg/6 d	mg/100 mL	mg/g	$\mu\text{g}/6 \text{ d}$	$\mu\text{g}/100 \text{ mL}$	$\mu\text{g/g}$
SPI	322 ± 21^1	10.3 ± 0.3	225 ± 7	854 ± 145	141 ± 16	188 ± 8
SP	333 ± 24	10.3 ± 0.2	222 ± 4	875 ± 122	131 ± 14	183 ± 9
SCP	300 ± 22^b	10.3 ± 0.2	224 ± 4	826 ± 126	124 ± 17	193 ± 13
SC	345 ± 31^c	10.8 ± 0.8^{abc}	228 ± 8	826 ± 109	133 ± 19	191 ± 16

¹ Means $\pm$ SD for seven rats. ^{a,b,c} Significantly different from SPI, SP and SCP groups at 5% level, respectively.

蓄積が高度にみられた腎切片の銀染色像（コッサ法）で Ca 蓄積が組織学的にも証明された。また、組織像から得た Ca 沈着度のスコアと原子吸光法で求めた Ca 濃度との関係を Fig. 6 に示した。破線はカゼイン食群より腎 Ca 濃度の高い SPI 食群の個体19例についてみたものであり、実線はその内でより高値を示した個体12例（SPI+卵殻 Ca 群）についての関係であるが、いずれも両者間に有意な正相関がみられた。SPI 投与ラットでみられた nephrocalcinosis はラットに特異的なものであるがヒトにおけるその可能性については今後の検討課題である。

腎臓の組織標本の作成ならびに鏡検所見の判読につき本学医学部実践栄養学教室岸野泰雄教授の御協力、御助言をいただいた。深く謝意を表する。

文 献

- 1) Lyon DB (1984) : Studies on the solubility of Ca, Mg, Zn, and Cu in cereal products. *Am J Clin Nutr*, **39**, 190-195.
- 2) Rümenapf G and Schülle PO (1988) : The influence of citrate on the duodenal absorption of calcium in the rat. *Calcif Tissue Int*, **42**, 326-330.
- 3) Lönnerdal B, Cederblad A, Davidsson L and Sandstrom B (1984) : The effect of individual

components of soy formula and cows' milk formula on zinc bioavailability. *Am J Clin Nutr*, **40**, 1064-1070.

- 4) Carolyn AE and Greger JL (1991) : Dietary citrate and kidney function affect aluminum, zinc and iron utilization in rats. *J Nutr*, **121**, 1755-1762.
- 5) Harris RS (1955) : Phytic acid and its importance in human nutrition. *Nutr Rev*, **13**, 257-259.
- 6) Sharpe LM, Peacock WC, Cooke R and Harris RS (1950) : The effect of phytate and other food factors on iron absorption. *J Nutr*, **41**, 433-446.
- 7) Fordyce EJ, Forbes RM, Robbins KR and Erdman JW (1987) : Phytate×calcium/zinc molar ratios : are they predictive of zinc bioavailability? *J Food Sci*, **52**, 440-444.
- 8) Ritskes-hoitinga J and Beynen AC (1991) : Nephrocalcinosis in the rats : a literature review. *Pro Food Nutr Sci*, **16**, 85-124.
- 9) 安川 修 (1988) : 尿路結石症におけるクエン酸療法の臨床的検討—尿路結石症患者のクエン酸排泄量の検討とクエン酸剤投与による治療効果の検討—。日泌尿会誌, **79**, 620-628.