

大豆たん白質からのカルシウム吸収促進ペプチドの作出

金 東浩・鈴木泰子・永沼孝子・小川智久・村本光二*

東北大学大学院農学研究科

Inhibition of Calcium Carbonate Crystallization by Soybean Protein Hydrolysate and Its Promotion Effect on Calcium Absorption

Dong Hao JIN, Yasuko SUZUKI, Takako NAGANUMA,
Tomohisa OGAWA and Koji MURAMOTO

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai 981-8555

ABSTRACT

Many investigations into mineral bioavailability are concerned with improving the dietary supply of minerals. Casein phosphopeptide (CPP) is known to enhance the passive calcium absorption from the small intestine by inhibiting the precipitation of calcium phosphate and increasing the concentration of soluble calcium. We found that acidic peptides could also inhibit the crystal growth of supersaturated calcium carbonate solution. In this study, we hydrolyzed soybean protein, in which Glu/Gln and Asp/Asn comprise 35% of total amino acid residues, using several proteases and investigated the inhibitory activity of the hydrolysates on the crystal growth. Each hydrolysates showed different strength of the activity, suggesting the key role of the structure of peptides for the activity. The potency of a soybean protein hydrolysate was less than one tenth of that of a tryptic digest of casein, however, it increased over four fold by treating the soybean protein hydrolysate with glutaminase. The magnitude corresponded to the conversion rate of Gln residues to Glu residues. Furthermore, the potency increased by the addition of some food constituents, such as sodium chloride, citric acid, lactose, into the reaction mixture. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 63-68, 1998.

Key words : soybean protein hydrolysate, calcium, glutamic acid, glutaminase

カルシウムの腸管吸収は小腸上部の能動輸送と下部の受動輸送で行われているが、食事摂取時のカルシウム吸収率を向上させるには、とくに受動輸送における吸収率を増加させる必要があるといわれている。カゼ

インフォスホペプチド (CPP) は、小腸からのカルシウムの吸収率を高めることが知られているが、これは CPP のリン酸化セリン残基がカルシウム塩の結晶形成を防ぎ受動輸送を高めるためと理解されている¹⁾。

大豆たん白質がカルシウムやマグネシウムイオンと結合して沈澱する特性は、豆腐の製造に利用されてい

*〒 981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

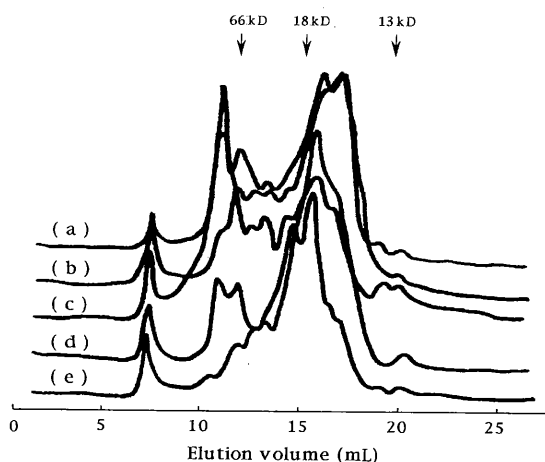


Fig. 1. High-performance gel filtration chromatograms of soybean protein hydrolysates on Superdex 75 (1 × 30 cm) eluted with 5 M urea in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5). (a), protease M; (b), protease N; (c), protease P; (d), protease S; (e), pepsin.

るが、大豆たん白質を分解して生成したペプチドにも金属イオンとのキレート形成が観察され、これがペプチドにみられる抗酸化性の一つの発現要因となっている²⁾。また、リン酸化セリン残基が存在しない場合でも、酸性アミノ酸が適切に配置されていればペプチドはカルシウム塩の結晶化を阻害する³⁾。そこで本研究では、大豆たん白質に35%も含まれる酸性アミノ酸及びそのアミド体に着目し、カルシウム塩結晶化に対する強い阻害作用をもつ分解物を、バイオリアクターによる限定分解と脱アミド化反応によって大豆たん白質から作り出すことを目的にした。

方 法

大豆たん白質の酵素分解

酸沈澱分離大豆たん白質2gを蒸留水100mLに懸濁し、次の5種類のたん白質分解酵素(天野製薬)で

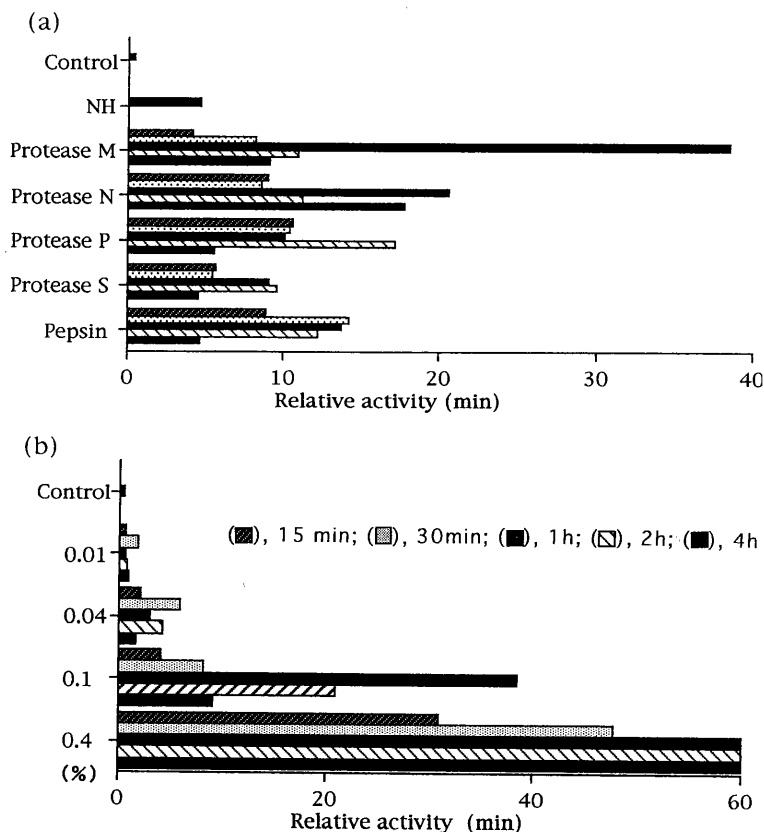


Fig. 2. Inhibition of calcium carbonate crystallization by soybean protein hydrolyzed with various kinds of proteases for various periods. (a) Sample conc.: 0.1%. NH : Unhydrolyzed sample. (b) Inhibition by various concentrations of protease M digests.

15分から4時間攪拌しながら加水分解した (S/E=100/1)⁴⁾。プロテアーゼ M (分解条件(以下同): *Aspergillus oryzae*, pH 3.0, 50°C), プロテアーゼ N (*Bacillus subtilis*, pH 7.0, 55°C), プロテアーゼ P (*Aspergillus melleus*, pH 8.0, 45°C), プロテアーゼ S (*Bacillus sp.*, pH 8.0, 70°C), ペプシン (ブタ胃, pH 2.0, 37°C)。酵素分解液を 20 mL ずつ分取し, 3 分間煮沸処理して酵素を失活させた。分解液の pH を 7 に調整した後, 凍結乾燥した。牛乳カゼイン 2 g は 50 mM 炭酸水素アンモニウム 100 mL に懸濁, トリプシン (S/E=100/1) で 37°C, 24 時間加水分解した後, 可溶画分を凍結乾燥して用いた。

カルシウム塩結晶化阻害作用の測定

pH 自動滴定装置を用い, 以下の手順でカルシウム塩結晶化阻害作用を測定した³⁾。反応セルに 40 mM 塩化カルシウム水溶液 1.0 mL, 蒸留水 1.2 mL, 試料液 1.0 mL を加え, 37°C で 10 分間攪拌した。これに, 37°C に加温しておいた 40 mM の炭酸水素ナトリウム水溶液 0.8 mL を加え (全量 4.0 mL), 同時に pH スタットを作動させた。反応セルを 37°C に保持して 60 分間の反応を追跡した。カルシウム塩の結晶化にともない H⁺ が放出されて pH が低下するので, 0.1 M NaOH を滴下して pH を 8.5 に保持した。この時, コントロールにおける炭酸カルシウムの結晶生成量が最大となったときの 0.1 M NaOH 消費量の 1/2 量に相当するまでの時間を誘導時間と定め, 試料における誘導時間の長さから阻害活性の強さを比較した。

グルタミンの脱アミド化

大豆たん白質分解物の 3% 溶液にグルタミナーゼ (天野製薬) (S/E=50/1) を加えて pH 7, 50°C で反応させ, ペプチド中のグルタミンをグルタミン酸に変換した。脱アミド化反応は, 分解物をアクチナーゼ E (科研製薬) およびペプチダーゼ R (天野製薬) で徹底分解後, ダブシクロライドによるプレカラムラベル法でアミノ酸組成分析を行って追跡した⁵⁾。

回転膜型バイオリアクターによる分解

排除限界 50 kDa の膜カートリッジ (膜面積 400 cm²) を装着した回転限外濾過膜装置 (Memorex 社) を組み込んだバイオリアクターを用いて大豆たん白質を酵素分解した⁶⁾。透過流速 1.5~2.0 mL/min で得られた透過液と循環液を採取し, それぞれを凍結乾燥してカルシウム塩結晶化阻害作用を測定した。

結果と考察

大豆たん白質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用

大豆たん白質を各プロテアーゼで 1 時間酵素分解し, それらの分子量分布をゲル濾過クロマトグラフィーで調べた (Fig. 1)。プロテアーゼ M, N, P, S 分解物では 18 kDa 前後に 2 つの溶出ピークがみられ, 互いに異なる分子量のペプチドが生成した。またペプシン分解物では 13~18 kDa に溶出ピークがみられた。これらの分解物の 0.1% 濃度におけるカルシウム塩結晶化

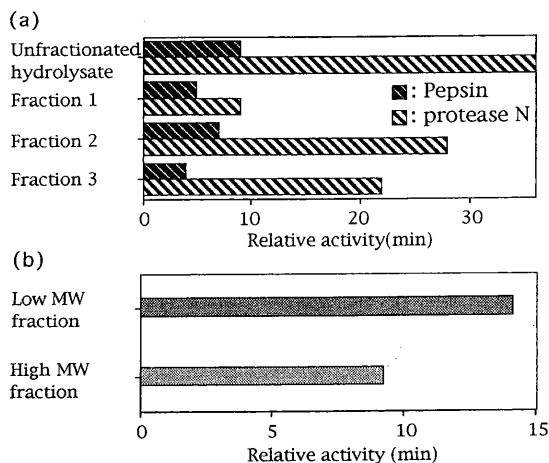


Fig. 3. Inhibition of calcium carbonate crystallization by protein hydrolysates obtained by a vortex-flow membrane bioreactor. (a) Egg white albumin was hydrolyzed with pepsin or protease N. Fraction 1, MW > 50,000; fraction 2, MW 50,000 ~ 10,000; fraction 3, MW < 10,000. Sample conc.: 0.125%. (b) Soybean protein was hydrolyzed with protease M. Low MW fraction, MW < 50,000; high MW fraction, MW > 50,000. Sample conc.: 0.025%.

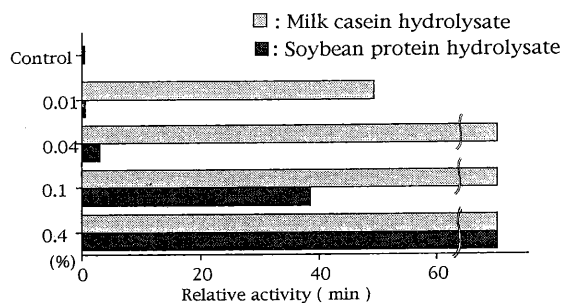


Fig. 4. Comparison of the inhibitory activities of soybean protein and milk casein hydrolysates against the calcium carbonate crystallization. Soybean protein and milk casein were hydrolyzed with protease M for 1 h and trypsin for 24 h, respectively.

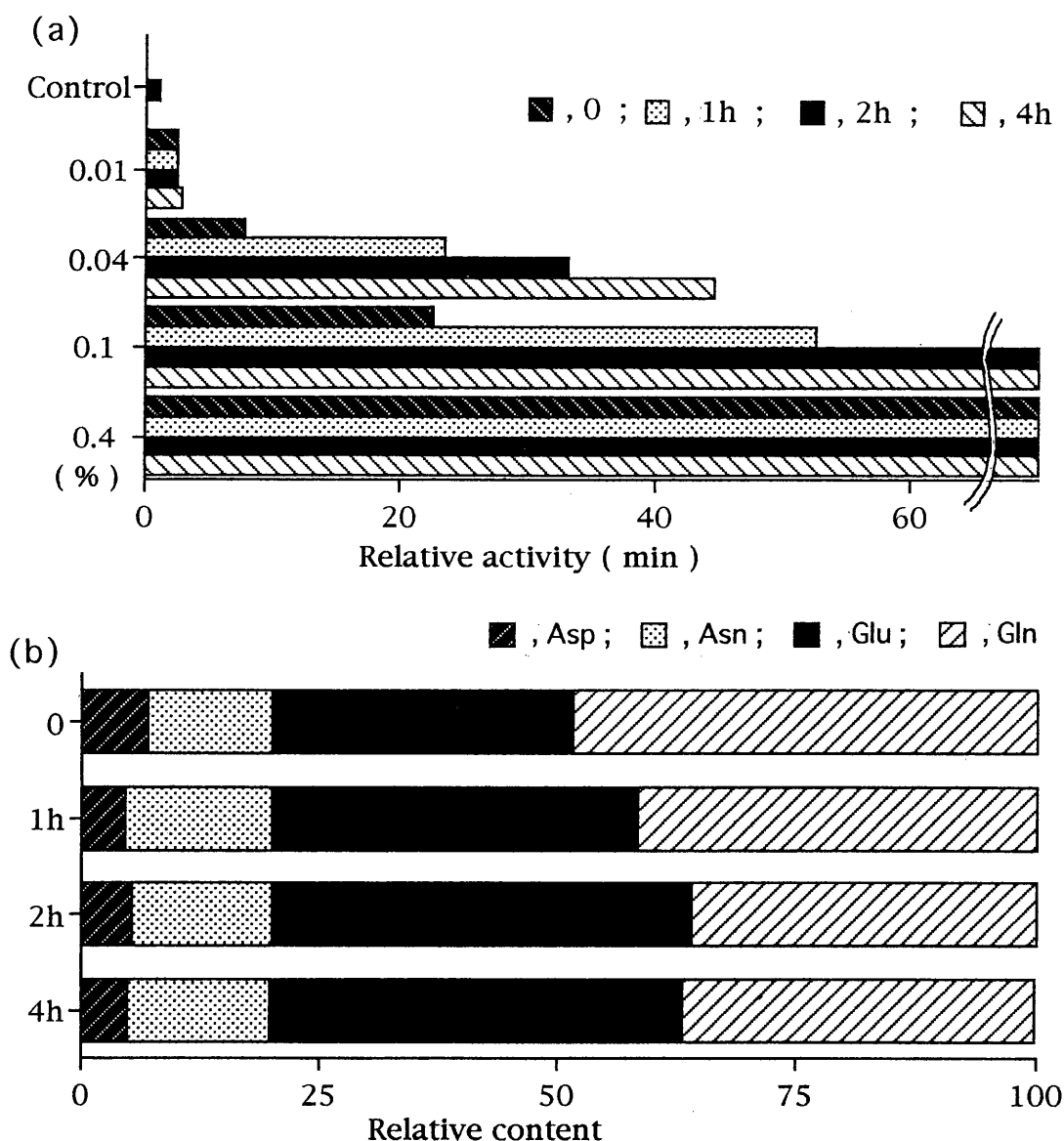


Fig. 5. Inhibition of calcium carbonate crystallization by soybean protein hydrolysate treated with glutaminase for various periods (a). Soybean protein was hydrolyzed with protease M for 1 h. (b) Relative contents of Asp/Asn and Glu/Gln in soybean protein hydrolysate estimated by enzymatic digestion with actinase and peptidase R.

阻害作用を比較したところ、プロテアーゼ M で 1 時間分解したものに最も強いカルシウム塩結晶化阻害作用が検出された (Fig. 2)。大豆たん白質のままでは阻害作用は小さく、プロテアーゼによって差があるものの、酵素分解時間が増加すると作用が増強し、さらに分解を続けると阻害作用が減少した。また、どの酵素分解物でも濃度の増加にともない阻害作用が増強した。こ

れらの結果から、ペプチドのカルシウム塩結晶化阻害作用には、プロテアーゼの基質特異性に基づく構造的要因が強く影響していることが明らかになった。

回転膜型バイオリアクターによる酵素分解

プロテアーゼ M を用いて大豆たん白質を回転膜型バイオリアクターで連続分解することにより、透過液から 13 kDa ~ 18 kDa に分子量分布をもつ分解物を効

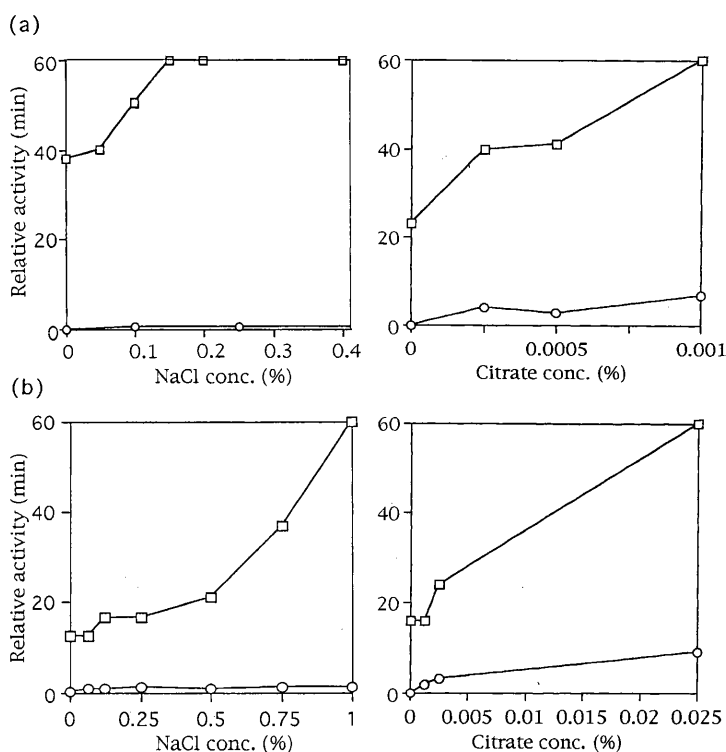


Fig. 6. Effects of NaCl or citric acid on the inhibitory activity of protein hydrolysates against the calcium carbonate crystallization. (a) 0.025% soybean protein hydrolysate. (b) 0.125% egg white albumin hydrolysate. (○), NaCl or citric acid alone; (□), NaCl or citric acid + hydrolysate.

率的に產生することが可能であった (Fig. 3). 卵白アルブミンを酵素分解したときの阻害作用の強さは、大豆たん白質分解物の5分の1以下であった。さらに卵白アルブミン分解物を異なる排除限界をもつ回転濾過膜を連結して分画したところ、高分子領域の画分より低分子の画分で強い阻害作用がみられた。

脱アミド化によるカルシウム塩結晶化阻害作用の増強

大豆たん白質のプロテアーゼM分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用の強さは、カゼインのトリプシン分解物の10分の1以下であった (Fig. 4). 大豆たん白質に含まれる酸性アミノ酸の50～60%はアミド体として存在している。そこで大豆たん白質分解物の阻害作用を増強するために分解物をグルタミナーゼで処理して、経時的にグルタミン酸の増加量と阻害作用の変化を調べた。2時間までは処理時間に比例してグルタミン酸の濃度は増加し、それにともないカルシウム塩結晶化阻害作用が強まった (Fig. 5). 1時間処理で阻害作用は2.5倍に増強、処理時間を4時間にすることによって約4倍の増強が可能であった。

共存物質によるカルシウム塩結晶化阻害作用の増強

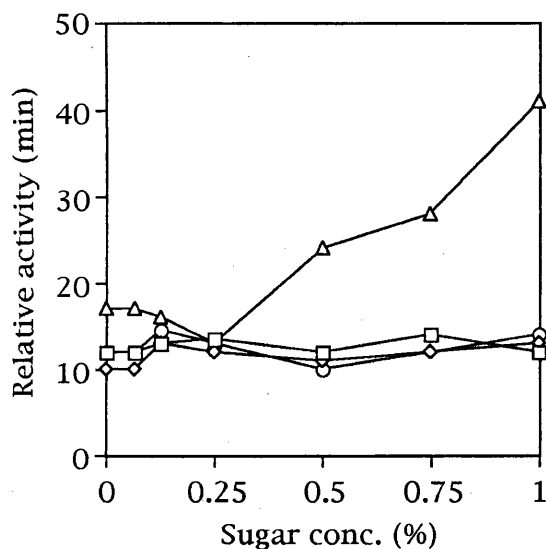


Fig. 7. Effects of sugars on the inhibitory activity of egg white albumin hydrolysate against the calcium carbonate crystallization. Sample conc. : 0.0625%. (□), Glucose; (◇), galactose; (○), sucrose; (△), lactose.

食餌成分である食塩、クエン酸、そして糖類を共存させたときのたん白質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用の変化を調べた。食塩には単独では全くカルシウム塩結晶化阻害作用はみられなかったが、0.1%大豆たん白質分解物に食塩を添加するとその量に応じて阻害作用が増強した(Fig. 6)。同様な増強作用はクエン酸の添加でもみられたが、糖類では乳糖においてのみ観察された(Fig. 7)。

ラットにおけるカルシウム吸収促進作用

大豆たん白質またはその分解物を14%含む食餌を

ラットに与え、カルシウムの吸収率を測定した。大豆たん白質を与えた群では、コントロール食(全卵粉末)に比べ、吸収率の増加が観察されたが、分解物での増加は確認できていない。これは、分解物のカルシウム結晶化阻害作用がカゼイン分解物に比べて極めて弱かったためと理解され、今後、分解物をグルタミナーゼで処理すること、さらに食塩などの食品関連成分を添加することによって阻害作用を強め、再度、吸収率を測定する計画である。また、溶液状態で経口投与する方法も検討している。

要 約

大豆たん白質に35%も含まれる酸性アミノ酸及びそのアミド体に着目し、カルシウム塩結晶化に対する強い阻害作用をもつ分解物を、バイオリアクターによる限定分解と脱アミド化反応によって大豆たん白質から作り出した。酸沈澱分離大豆たん白質を5種類のプロテアーゼで加水分解し、各分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用をpH自動滴定装置を用いて測定した。酵素分解した大豆たん白質の阻害作用は増強した。しかし、分解を続けると阻害作用が減少し、またプロテアーゼの種類によって阻害作用の強さが異なることから、プロテアーゼの基質特異性に基づく構造的要因が阻害作用に強く影響していることが明らかになった。大豆たん白質のプロテアーゼMの1時間分解物と、カゼインのトリプシン分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用を比較したところ、後者は10倍以上強い作用を示した。しかし、大豆たん白質分解物をグルタミナーゼで処理すると、グルタミン酸残基の増加にともないカルシウム塩結晶化阻害作用が4倍以上に強化された。また、食塩、クエン酸、乳糖には単独では阻害作用はみられなかったが、0.1%大豆たん白質分解物に添加すると、その濃度に比例して阻害作用が増強した。

文 献

- 1) Sato R, Noguchi T and Naito H(1986): Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J Nutr Sci Vitaminol*, **32**, 67-76.
- 2) Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K and Nokihara K(1998): Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*, **46**, 49-53.
- 3) Muramoto K, Yako H, Murakami K, Odo S and Kamiya H(1994): Inhibition of the growth of calcium carbonate crystals by multiple lectins in the coelomic fluid of the acorn barnacle *Megabalanus rosa*. *Comp Biochem Physiol*, **107B**, 401-409.
- 4) Chen HM, Muramoto K and Yamauchi F(1995): Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *J Agric Food Chem*, **43**, 574-578.
- 5) Muramoto K and Kamiya H(1990): Recovery of tryptophan in peptides and proteins by high-temperature and short-term acid hydrolysis in the presence of phenol. *Anal Biochem*, **189**, 223-230.
- 6) Zhang Y, Muramoto K and Yamauchi F(1996): Hydrolysis of soybean proteins by a vortex flow filtration membrane reactor with *Aspergillus oryzae* proteases. *J Food Sci*, **61**, 928-931.