

分離大豆たん白質からのフィチン酸の酸抽出除去と そのたん白質特性への影響

加藤美樹・金 東浩・永沼孝子・小川智久・村本光二*

東北大学大学院生命科学研究科

Removal of Phytic Acid from Soy Protein Isolates and Its Effect on Protein Functionality

Miki KATOH, Dong-Hao JIN, Takako NAGANUMA, Tomohisa OGAWA
and Koji MURAMOTO

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai 981-8555

ABSTRACT

Soy protein isolates contain about 2% of phytic acid, which is considered as an antinutrient due to its inhibitory effect on mineral bioavailability. A simple acid extraction method was developed to reduce phytate content. By extracting with 0.6 M HCl, 96% of phytic acid could be removed. The acid extraction significantly changed the gel filtration patterns of soy proteins, however, there was no change in their subunit compositions on SDS-PAGE. The digestibility of soy proteins with pepsin not with trypsin improved upon the extraction. The increase of the surface hydrophobicity of phytate-removed soy proteins resulted in the increase of its emulsifying activity. Moreover, the hydrolysates derived from phytate-removed soy proteins accelerated the calcium transport across the Caco-2 cell monolayer. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 41-46, 2002.

Key words : soybean, soy protein, phytic acid, calcium, Caco-2 cell

フィチン酸は強い金属キレート作用を持ち、抗酸化性や抗腫瘍活性を示す一方、腸管からのカルシウムや鉄イオンの吸収を阻害することが知られている¹⁾。大豆に含まれるフィチン酸の大部分はたん白質と結合しており、通常の方法で調製した分離大豆たん白質は2～3%のフィチン酸を含有する。筆者らは、大豆たん白質の酵素加水分解物にカルシウム塩の結晶化阻害

作用を見出し、グルタミナーゼ処理やラクトースなどの添加物による阻害作用の増強効果を明らかにした²⁾。このときカルシウムと相互作用するフィチン酸を分離大豆たん白質から除去するために、既報の種々の方法を試みたが簡便で効率的なものはなかった。

本研究では、希塩酸抽出によって分離大豆たん白質からフィチン酸を除去する簡便な方法を検討するとともに、その酸抽出が大豆たん白質の物理化学的な機能特性や酵素消化性に及ぼす影響を検討した。また、腸

*〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

管モデル系におけるカルシウム透過性に対する大豆たん白質分解物およびフィチン酸の影響を調べた。

方 法

フィチン酸の希塩酸抽出除去

分離大豆たん白質 (SPI, フジプロR) (2 g) を希塩酸 (0.1, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 M) 100 mL に懸濁し, 30 分間室温に放置後, 遠心分離 (6,000×g, 20 分間) した。沈澱を蒸留水に懸濁し, pH を 5.5 に調節後, 再度, 遠心分離を行った。この沈澱を蒸留水に懸濁して凍結乾燥した。フィチン酸含量は, Wade 試薬を用いて測定した³⁾。

酸沈澱大豆たん白質 (APP) および 7S, 11S グロブリンは, Thanh & Shibasaki⁴⁾ の方法に従って調製した。酸処理前後のたん白質組成を, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および Superdex 200 ゲルろ過 HPLC で調べた。

酵素消化性

たん白質試料を 0.06 M HCl または 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) に懸濁し (10 mg/mL), ペプシンまたはトリプシンを加えて (S/E=100:1), 37°C で消化した。最終濃度が 15% になるように 50% トリクロロ酢酸を加えて未消化たん白質を沈澱させ, 上清の 280 nm の吸光度から消化性を調べた。

表面疎水性と乳化特性

1-anilino-8-naphthalene-sulfonate (ANS) を蛍光プローブに用い, たん白質の表面疎水性を測定した。異なる濃度 (0.005~0.02 mg/mL) の試料溶液 (4.0 mL, 50 mM リン酸緩衝液, pH 8.0) に 8 mM ANS (0.02 mL)

を加え, 蛍光強度 (Ex: 390 nm, Em: 470 nm) を測定した。その傾きから表面疎水性を比較した。

0.1% たん白質溶液 (50 mM リン酸緩衝液, pH 8.0) 3 mL にコーン油 1 mL を加えて氷浴中で超音波処理し, エマルジョンを作った。このエマルジョン 0.05 mL を 0.1% SDS 溶液 5 mL にすばやく加えて 500 nm の吸光度を測定した。たん白質 1 mg 当たりの吸光度を乳化活性指数 (EAI) とした。

カルシウム塩結晶化阻害作用

炭酸カルシウムの結晶生成に伴う水素イオンの放出量を pH スタットメーターで滴定した。コントロールの 0.1 N NaOH 消費量の 2 分の 1 に達するまでの時間を誘導時間として活性の強さを比較した。

Caco-2 単層膜におけるカルシウムの透過性

ヒト結腸上皮がん細胞 (Caco-2) の単層膜を透過実験用 2 層構造 12 穴プレートに作成した。細胞培養インサート上の単層膜にカルシウム塩と試料の混合溶液を加え, 60 分間インキュベート後のカルシウム透過量を原子吸光光度計を用いて分析した。大豆ペプチドは, SPI をプロテアーゼ M (天野製薬) (S/E=100:1) で 1 時間, 37°C で加水分解して調製した。

結果と考察

大豆たん白質からのフィチン酸除去

分離大豆たん白質に含まれるフィチン酸 (2.5%) の除去を, 4 つの方法 (透析法, アルカリ抽出法, NaCl 抽出法, HCl 抽出法) で比較した。フィチン酸の除去率は, 各々, 52%, 56%, 84%, 96% であり, たん白質の回収率はいずれも 94~96% であった。次に異

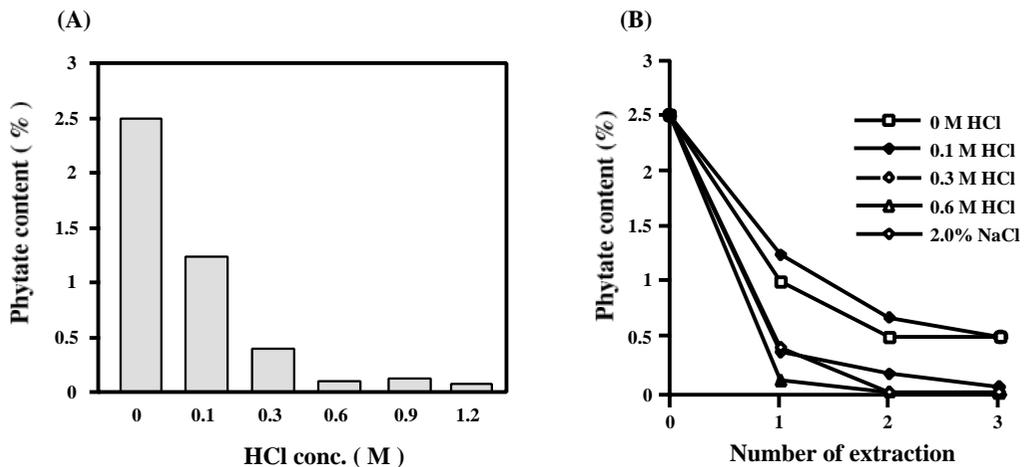


Fig. 1. Effects of HCl concentration on the extraction of phytic acid from soy proteins. The extraction was carried out with various concentrations of aqueous HCl for 30 min at room temperature.

なる濃度のHCl水溶液を用いて抽出を行った。0.6 M HClを用いて抽出すると約95%のフィチン酸を除去できた (Fig. 1)。0.3 M HClおよび2% NaClで2回抽出すると0.6 M HClで抽出したときと同程度のフィチン酸を除去できた。以降の実験では0.6 M HClで1回抽出してフィチン酸除去たん白質を調製した。

酸処理大豆たん白質の特性

0.6 M HCl抽出は大豆たん白質のゲルろ過クロマトグラフィーの分離パターンを大きく変化させたが (Fig. 2), SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析ではそのサブユニット組成に違いはみられなかった (Fig. 3)。なお, APPには約2%のフィチン酸が含まれていたが, 7Sグロブリンおよび11Sグロブリンにはフィチン酸は検出されなかった。

酸処理によって大豆たん白質の蒸留水に対する溶解性の低下がみられた。また, トリプシンに対する被消化性に大きな変化はみられなかったものの, ペプシン消化に対する感受性は増加した (Fig. 4)。これらはたん白質の高次構造および表面電荷の変化によると考えられた。そこで表面疎水性の変化を蛍光プローブANSを用いて測定した (Fig. 5)。酸処理したいずれの試料においても表面疎水性の増加が観察された。

表面疎水性が影響を及ぼすたん白質の機能特性として乳化性があげられる。予測されたようにフィチン酸を除去した大豆たん白質の乳化特性が向上した (Fig. 6)。この機能特性の向上は, 2% NaCl抽出でフィチン酸を除去した大豆たん白質でもみられ, 酸処理による高次構造だけでなく, フィチン酸除去による影響が大きいことが分かった。

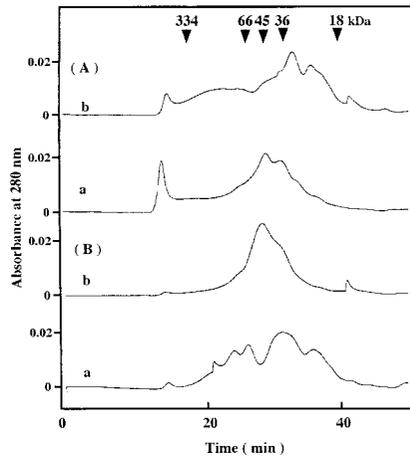


Fig. 2. Gel filtration HPLC chromatograms of 7S globulin (A) and 11S globulin (B) before (a) and after (b) 0.6 M HCl extraction.

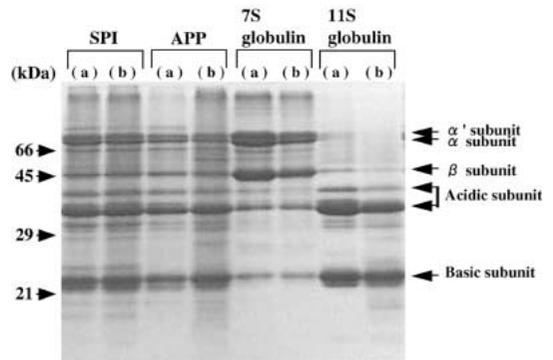


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of soy proteins before (a) and after (b) 0.6 M HCl extraction. SPI, soy protein isolates; APP, acid precipitated soy proteins.

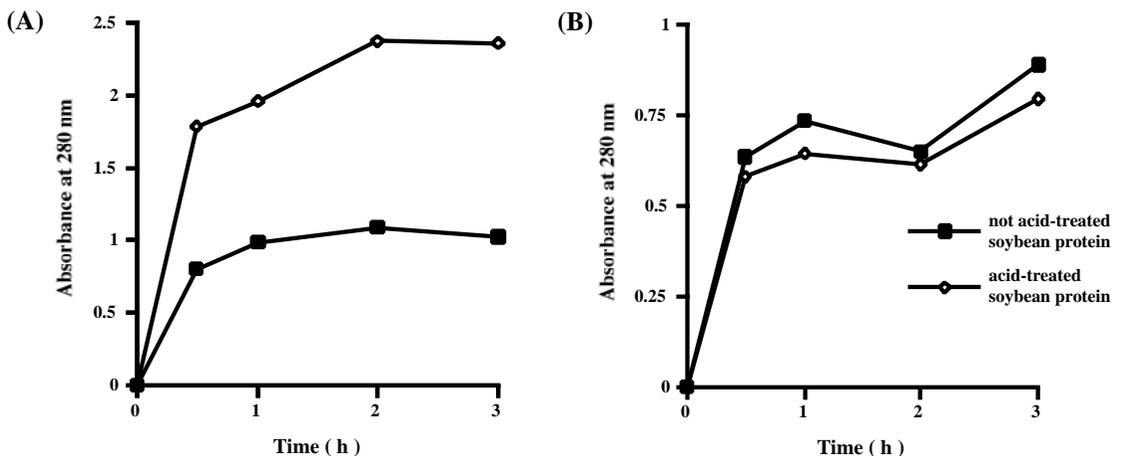


Fig. 4. Effect of 0.6 M HCl extraction on the digestibility with pepsin (A) and trypsin (B) of soy protein isolates before (filled square) and after (open square) 0.6 M HCl extraction.

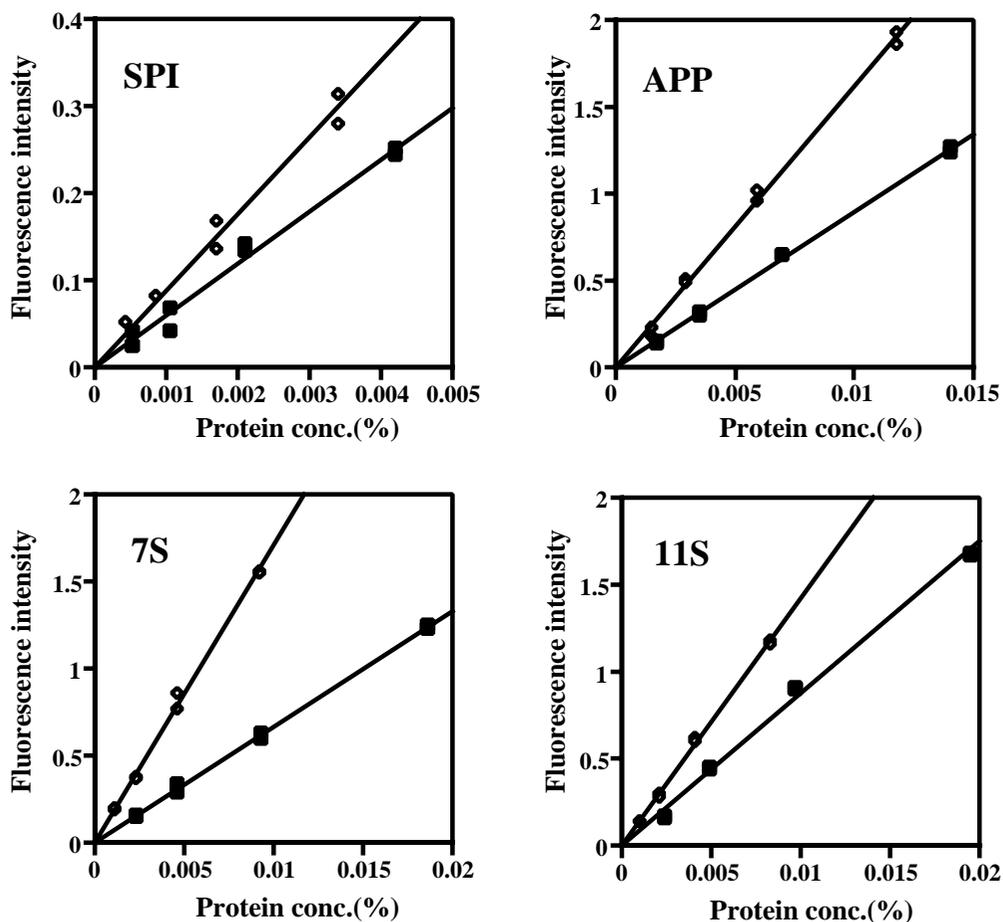


Fig. 5. Surface hydrophobicity of soy proteins before (filled square) and after (open square) 0.6 M HCl extraction. 1-Anilino-8-naphthalene-sulfonate (ANS) was used as a fluorescent probe by measuring its fluorescence intensity (Ex, 390 nm; Em, 470 nm). SPI, soy protein isolates; APP, acid precipitated soy proteins; 7S, 7S globulin; 11S, 11S globulin.

炭酸カルシウム結晶化阻害作用

APPおよびSPIの酸処理によりフィチン酸を除去し、そのときの炭酸カルシウムの結晶化阻害作用を測定した。フィチン酸にも結晶化阻害作用がみられたが、大豆たん白質からフィチン酸を除去しても阻害作用に大きな減少はみられなかった (Fig. 7)。このことから大豆たん白質自体にカルシウム塩結晶化阻害作用があることが確認できた。

Caco-2単層膜におけるカルシウムの透過性

Caco-2細胞の単層膜を腸管モデルとして、大豆たん白質分解物がカルシウムの透過性に与える影響を検討した。フィチン酸を除去した大豆たん白質から調製したペプチドはカルシウムの透過量を有意に増加させた (Fig. 8)。また、これにフィチン酸を添加したところ、カルシウムの透過量は減少した。このことからフィチ

ン酸はカルシウムの腸管膜透過性を阻害すること、フィチン酸を除去した大豆ペプチドには透過性を促進する作用があることが確認された。一方、カルシウム吸収を促進することが知られているラクトースを大豆ペプチドに添加したところ、さらにカルシウムの透過量は増加した。

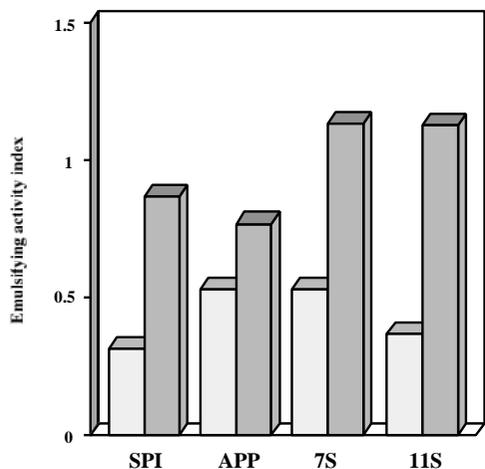


Fig. 6. Emulsifying activity of soy proteins before (left bar) and after (right bar) 0.6 M HCl extraction.

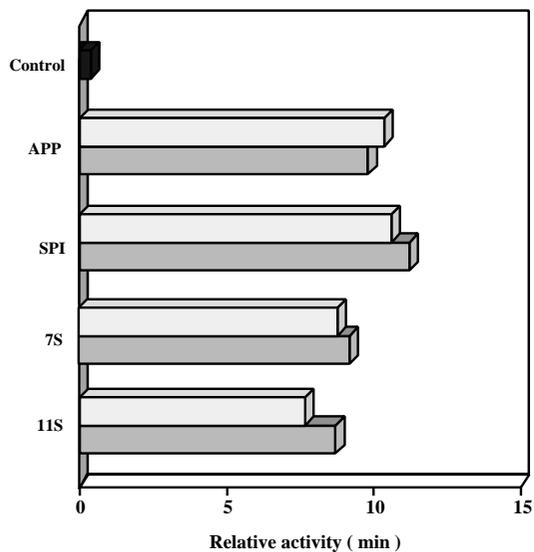


Fig. 7. Inhibitory activities of soy proteins toward calcium carbonate crystallization before (upper bar) and after (lower bar) 0.6 M HCl extraction.

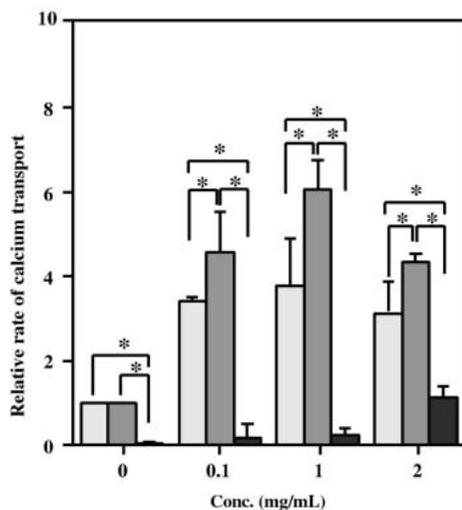


Fig. 8. Effects of soy protein hydrolysates on calcium transport across the Caco-2 cell monolayer. Soy protein hydrolysates were prepared by digesting SPI with protease M (S/E = 100 : 1) for 1 h at 37°C. Various concentration of SPI hydrolysates (left bar), phytate-removed SPI hydrolysates (middle bar), and phytate-removed SPI hydrolysates supplemented with sodium phytate (0.5 mg/mL) (right bar) were incubated with the Caco-2 cell monolayer in the presence of calcium ions for 60 min for the tests. ANOVA, Duncan's test; $P < 0.05$ (mean \pm SD).

要 約

分離大豆たん白質に含まれるフィチン酸(2.5%)を0.6 M HClで抽出除去した。フィチン酸の除去率は96%であり、たん白質の回収率は96%であった。酸抽出は大豆たん白質のゲルろ過クロマトグラフィーの分離パターンを大きく変化させたが、そのサブユニット組成には違いは見られなかった。フィチン酸の除去により大豆たん白質のペプシンによる被消化性と表面疎水性が増加した。それに伴い乳化特性が向上した。大豆たん白質の酵素分解物は、ヒト結腸上皮がん細胞(Caco-2)の単層膜におけるカルシウムイオン透過性を増加させ、フィチン酸を除去するとその透過性はさらに増加した。

文 献

- 1) Harland BF and Morris ER (1995) : Phytate: A good or a bad food component? *Nutr Res*, **15**, 733-754.
- 2) Jin DH, Zhang YZ, Suzuki Y, Naganuma T, Ogawa T, Hatakeyama E and Muramoto K (2000) : Inhibitory effect of protein hydrolysates on calcium carbonate crystallization. *J Agric Food Chem*, **48**, 5450-5454.
- 3) Latta M and Eskin M (1980) : A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J Agric Food Chem*, **28**, 1313-1315.
- 4) Thanh VH and Shibasaki K (1976) : Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem*, **24**, 1117-1121.