

フィチン酸除去・脱アミド化大豆たん白質の カルシウム吸収促進機能

熊谷日登美*

日本大学生物資源科学部

Enhanced Function of Calcium Absorption by Phytate-Removed and Deamidated Soybean Proteins

Hitomi KUMAGAI

College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa 252-8510

ABSTRACT

Calcium is an important mineral for the formation of bones and teeth. Currently, calcium intake of Japanese is nearly half that of Westerners, and does not meet the recommended level. The amount of calcium absorbed in the intestine is about 20-50% of intake. Therefore, increasing calcium absorption as well as intake is important for achieving optimal calcium status. Casein phosphopeptide (CPP) and calcium citrate malate (CCM) enhance calcium absorption, and are used in foods for specified health purposes. However, the use of these substances in foods is limited because of their low molecular weight, and CPP has a milky flavor, and CCM a sour taste. Soybeans are a traditional part of the Japanese diet and the isoflavones are known to inhibit calcium resorption in bones. However, phytate in soybeans renders calcium insoluble, and inhibits calcium absorption by the body. If one could enhance calcium absorption from soybeans, it would expand their use and decrease the calcium inadequacy in Japanese. We showed previously that the removal of phytate and the deamidation of acid amide from soybean proteins improves their calcium binding, and that about 70% of the total acid amide can be deamidated by ion-exchange resins without any detectable peptide-bond hydrolysis. In this study, we evaluated the calcium-binding properties of phytate-removed and deamidated soybean proteins (PrDS) during hydrolysis by digestive enzymes, and examined the enhancement effect of calcium absorption by PrDS on bone formation. The results indicate that PrDS retained the high calcium binding properties even after hydrolysis by digestive enzymes, and enhanced calcium absorption from the intestines. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 48-52, 2003.

* 〒252-8510 藤沢市亀井野1866

Key words: calcium absorption, phytate removal, deamidation, soybean protein, hydrolysis

カルシウムは骨や歯の形成に関わる重要なミネラルであるが、日本人のカルシウム摂取量は、欧米人の約半分で、栄養所要量をも満たしていない。摂取したカルシウムのうち、腸管内で吸収されるのは約20~50%とされていることから、日本人のカルシウム不足を解消するには、単に摂取量を増加させるだけでなく吸収量を増加させることも重要である。そのような効果を持った物質として、カゼインホスホペプチド (CPP) やクエン酸リンゴ酸カルシウム (CCM) 等が知られており^{1~3)}、これらは既に特定保健用食品に利用されている。しかし、これらは、低分子であるため保形性がなく、また、牛乳フレーバーや酸味を有することから、食品への利用が限られている。

大豆は、古来から日本人に親しまれてきた食品素材で、大豆中のイソフラボンは骨からのカルシウムの溶出を抑制することが明らかとなっているが^{4~6)}、その一方で、大豆中のフィチン酸はカルシウムを不溶化し体内でのカルシウム吸収を阻害すると言われている^{2,7)}。大豆にカルシウム吸収促進機能を付与できれば、大豆の用途拡大と日本人のカルシウム不足解消の両方に役立つと考えられる。

我々は、大豆たん白質からフィチン酸を除去後、脱アミド化により、そのカルシウム結合特性が改善すること⁸⁾、また、陽イオン交換樹脂で脱アミド化することにより、ペプチド結合の加水分解を起こさず、全アミドの約70%が脱アミド化可能であること⁹⁾を明らかにしている。

本研究では、フィチン酸除去・脱アミド化大豆たん白質 (PrDS) の消化酵素による加水分解過程におけるカルシウム結合量変化、および、PrDSの腸管内におけるカルシウム吸収促進効果について検討した。

方 法

大豆たん白質の調製

大豆たん白質は、既報に従い^{8,9)}、等電点沈殿法により調製した。

大豆たん白質からのフィチン酸除去

大豆たん白質からのフィチン酸除去は、既報に従い^{8,9)}、陰イオン交換樹脂 (アンバーライトIRA410, オルガノ社) により行った。

フィチン酸量の測定

大豆中のリンの大半はフィチン態であるため、フィ

チン酸量は、リン量を誘導発光分析装置 (ICP SPS1700R, セイコー電子工業) を用いて測定することにより求めた。

大豆たん白質の脱アミド化

フィチン酸除去大豆たん白質 (PrS) の脱アミド化は、既報に従い^{8,9)}、陽イオン交換樹脂 (アンバーライトIRC50, オルガノ社) により行った。これをフィチン酸除去・脱アミド化大豆たん白質 (PrDS) とした。

脱アミド化量の測定

陽イオン交換樹脂による試料の脱アミド化量は、イオン交換樹脂処理前後の大豆たん白質を塩酸で完全に脱アミド化し、生成したアンモニア量の差から算出した。アンモニア量の測定は、既報に従い^{8,9)}、Conway微量拡散法およびインドフェノール法により行った。

カルシウム結合量の測定

大豆たん白質に対するカルシウム結合量は、遊離カルシウム量をカルシウムイオンメーター (IM-40S, 東亜電波工業) により測定し、全カルシウム量から差し引くことにより求めた。

消化酵素による大豆たん白質の加水分解

PrDSが体内でカルシウム吸収促進効果を示すには、消化酵素により加水分解された後も、良好なカルシウム結合特性を保持している必要がある。そこで、主な消化酵素であるペプシン、トリプシン、キモトリプシンを用いて大豆たん白質を加水分解し、加水分解物のカルシウム結合特性を評価した。

加水分解度の測定

加水分解度は、トリクロロ酢酸可溶性窒素量の全窒素量に対する比から求めた。窒素量は、ケルダール法により定量した。

ラット小腸におけるカルシウム吸収量の測定

実験動物としては、Wistar系オスラット (5週齢) を用いた。カルシウムが最も吸収される回腸の上部と下部を結紮し、20 mg/mLのカルシウム溶液と共に各試料を注入した。20分後に門脈より採血し、遠心分離後、上清中のカルシウム量をICPにより測定した。

結 果 と 考 察

大豆たん白質からのフィチン酸除去量および脱アミド化量

陰イオン交換樹脂処理により、脱脂大豆中のリンの約92%が除去された。また、陽イオン交換樹脂処理に

より、大豆たん白質の約70%の酸アミドが脱アミド化された。

消化酵素処理によるPrSおよびPrDSの加水分解度変化

Fig. 1～3に、ペプシン、トリプシン、キモトリプシンで処理したPrSおよびPrDSの加水分解度の変化を示す。いずれの酵素を用いた場合も、PrSとPrDSの間の加水分解度の違いは、ほとんど見られなかった。ペ

プシンで処理した場合には、PrS、PrDS共に、約2時間後まで加水分解が進み、加水分解度約30%ではば一定になった。一方、トリプシンで処理した場合には約8%、キモトリプシンで処理した場合には約3.5%まで加水分解された。

なお、本酵素処理過程では、PrS、PrDS共に、脱アミド化はほとんど起こらなかった。

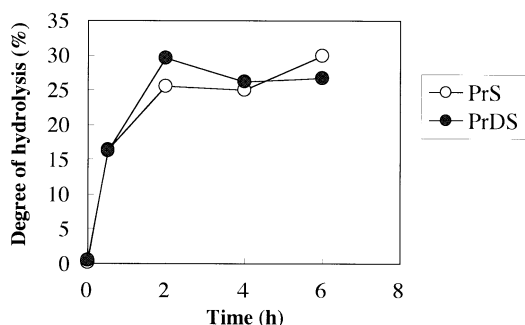


Fig. 1. Time course of the degree of hydrolysis of PrS and PrDS during hydrolysis with pepsin.

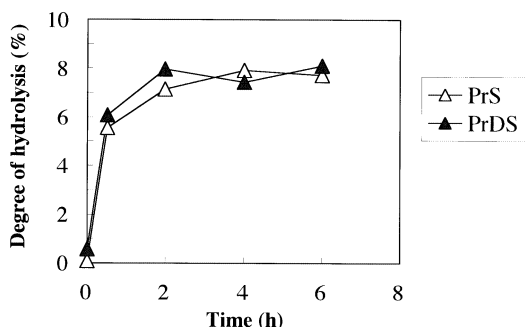


Fig. 2. Time course of the degree of hydrolysis of PrS and PrDS during hydrolysis with trypsin.

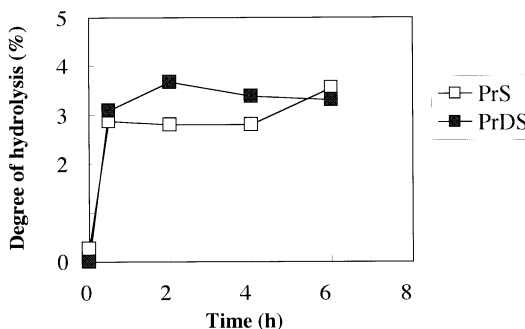


Fig. 3. Time course of the degree of hydrolysis of PrS and PrDS during hydrolysis with chymotrypsin.

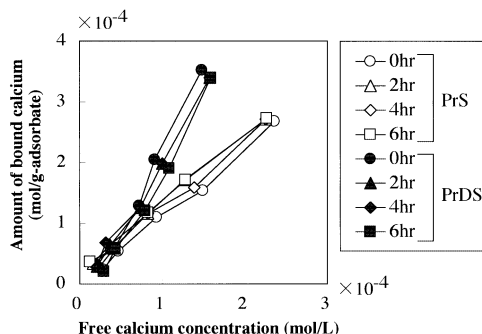


Fig. 4. Calcium-binding isotherms of PrS and PrDS hydrolyzed with pepsin for 0 - 6 hours.

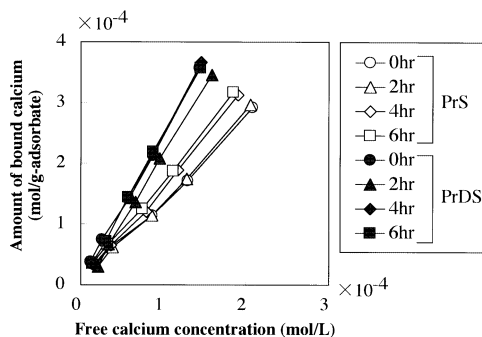


Fig. 5. Calcium-binding isotherms of PrS and PrDS hydrolyzed with trypsin for 0 - 6 hours.

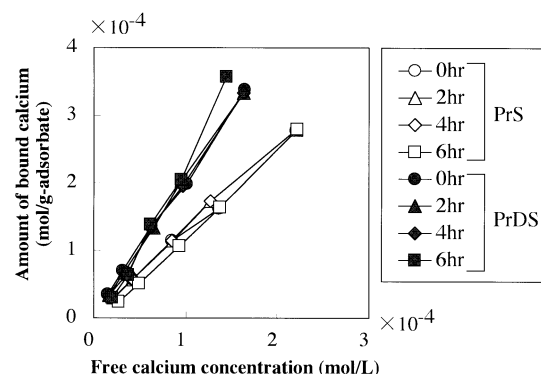


Fig. 6. Calcium-binding isotherms of PrS and PrDS hydrolyzed with chymotrypsin for 0 - 6 hours.

消化酵素による加水分解過程におけるPrSおよびPrDSのカルシウム結合特性変化

Fig. 4～6に、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン処理後のPrSおよびPrDSに対するカルシウム結合量変化を示す。いずれの酵素を用いた場合も、加水分解の進行に伴うカルシウム結合量に違いは見られず、加水分解処理時間が長くなっても、PrSのカルシウム結合量は低く、PrDSのカルシウム結合量は高い値を保持していた。

以上のことより、大豆たん白質に対するカルシウム結合量には、分子量よりも側鎖の酸性官能基量が大きく影響を与えることが示唆された。

PrDSの小腸におけるカルシウム吸収促進効果

Fig. 7に、カルシウム溶液と共にPrDSをラット回腸に注入し20分後の門脈血液中のカルシウム濃度を示す。PrDSの注入量が増加するにつれ、門脈血液中のカルシウム濃度は増加し、PrDSが小腸内においてカルシウム吸収促進効果を有することが明らかとなった。

Table 1に、カルシウム溶液と共にPrDS、PrDS加水分解物、CPPをラット回腸に注入し20分後の門脈血液中のカルシウム濃度を示す。カルシウム溶液のみを注入した場合には、門脈血液中のカルシウム濃度の変化は見られなかった。しかし、PrDS加水分解物を腸管に注入した場合には、門脈血液中のカルシウム濃度は、PrDS未分解物注入の時よりはやや低かったものの、カルシウム溶液のみ注入した時よりも有意に高くなった。このことから、PrDSは消化酵素で加水分解後も、カルシウム吸収促進効果を有していると考えられる。

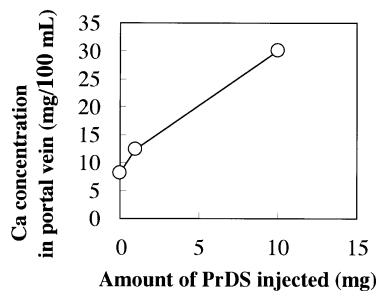


Fig. 7. Calcium concentration in portal vein 20 minutes after the injection of calcium and PrDS solution into small intestine.

Table 1. Calcium concentration in portal vein 20 minutes after the injection of calcium and proteins/peptides solution into small intestine

Protein/peptide	Ca concentration in portal vein (mg/100 mL)
Before injection	13.08 ± 5.43 ^a
20 min after injection	
Without protein or peptide	13.06 ± 1.61 ^a
PrDS	30.00 ± 2.88 ^b
PrDS hydrolyzed with pepsin	20.42 ± 2.60 ^b
PrDS hydrolyzed with trypsin	20.83 ± 2.80 ^b
PrDS hydrolyzed with chymotrypsin	22.50 ± 1.41 ^b
Casein phosphopeptide	25.35 ± 5.21 ^b

Mean ± SE (n=5). Values with different letters are significantly different at $P<0.05$.

要 約

従来、カルシウムの利用効率が低いとされている大豆たん白質に、カルシウム吸収促進効果を付与する目的で、大豆たん白質から、カルシウム吸収阻害物質とされるフィチン酸を除去後、カルシウムと適度に結合可能な酸性官能基を増加させるため脱アミド化を行った。陰イオン交換樹脂で処理することにより、脱脂大豆中のリンの約92%が除去された。また、弱酸性陽イオン交換樹脂で処理することにより、大豆たん白質の約70%の酸アミドが脱アミド化された。カルシウムが吸収され小腸に到達するまでに、たん白質は消化酵素で加水分解される。そこで、主な消化酵素であるペプシン、トリプシン、キモトリプシンでPrDSを加水分解した。その結果、いずれの消化酵素で加水分解した場合も、PrDSは高いカルシウム結合特性を保持していた。PrDSの小腸におけるカルシウム吸収促進効果は、PrDSの濃度依存的に高くなった。また、PrDSは、消化酵素で加水分解された後も、カルシウム吸収促進効果を有していた。

文 献

- 1) Sato R, Noguchi T and Naito H (1983): The necessity for the phosphate portion of casein molecules to enhance Ca absorption from the small intestine. *Agric Biol Chem*, **47**, 2415-2417.
- 2) 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.
- 3) Saito Y, Lee YS and Kimura S (1998): Minimum effective dose of casein phosphopeptides (CPP) for enhancement of calcium absorption in growing rats. *Internat J Vit Nutr Res*, **68**, 335-340.
- 4) Harrison E, Adjei A, Ameho C, Yamamoto S and Kono S (1998): The effect of soybean protein on bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol*, **44**, 257-268.
- 5) Picherit C, Chanteranne B, Pelissero CB, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP and Coxam V (2001): Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomised rat. *Br J Nutr*, **85**, 307-316.
- 6) Picherit C, Pelissero CB, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Barlet JP and Coxam V (2001): Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr*, **131**, 723-728.
- 7) Erdman JW Jr (1979): Oilseed phytates: Nutritional implications. *JAOCs*, **56**, 736-741.
- 8) Kumagai H, Shizawa Y, Sakurai H and Kumagai H (1998): Influence of phytate removal and structural modification on the calcium-binding properties of soybean globulins. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 341-346.
- 9) Kumagai H, Ishida S, Koizumi A, Sakurai H and Kumagai H (2002): Preparation of phytate-removed, deamidated soybean globulins by ion exchangers and characterization of their calcium-binding ability. *J Agric Food Sci*, **50**, 172-176.