

カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の調製

梅谷かおり*, 苔庵泰志*, 山岡千鶴*, 日比野剛*, 栗田 修*

Preparation for the Complex of Casein Peptide-Pectin

Kaori UMETANI, Yasushi KOKEAN, Chizuru YAMAOKA,
Tsuyoshi HIBINO and Osamu KURITA

Both pectin and peptide derived from milk casein are known to have various physiological functions. Thus, we tried to produce new functional food materials by complexing them. In this study, the peptides were bound to pectin by alcohol precipitation with intramolecular association. The casein peptide-pectin complex was found to differ in molecular weight distribution and amino acid content depending on the treated proteolytic enzyme. In addition, we found optimal conditions to powder this complex by mixing maltodextrin with the complex and spray drying.

Key words: Casein, Pectin, Complex, Peptide, Identification

1. はじめに

三重県の南勢地域、特に紀州においては、かんきつ類の栽培が盛んである¹⁾。かんきつ類の果皮には多糖のペクチンが豊富に含まれており、整腸作用や生活習慣病の予防効果、美容効果などを有すること²⁾が知られている。一方、牛乳の主要なタンパク質成分であるカゼインは抗血栓作用や血圧降下など、様々な生理機能を有すること³⁾が知られており、さらにカゼインを酵素処理したペプチドの機能性についての研究が進められている⁴⁾。本研究では、これらの素材を複合化し、それぞれの機能を併せ持つ食品素材を開発することで、取り扱いが簡便になることが期待できると考え、カゼインを酵素処理したペプチドとペクチンを種々の温和な条件で複合化することを試みた。また、この複合体が食品素材として、計量等のハンドリング性を良くするため、粉末化の検討を行ったので報告する。

2. 材料と実験方法

2. 1 材料

カゼインとして、試薬のカゼインナトリウム（東京化成工業製）を用いた。カゼイン分解用のタンパク質分解酵素として、表1に示す Newlase（至適 pH 3.0, sigma 製 P-0107）、Protease（至適 pH 7.5, EC 3.4.24.32, sigma 製, P-5647）、および Subtilisin A（至適 pH 9.7, ICN 社製, 1-800-854-0530）の3種類を用いた。なお、Newlase の1ユニットは、カゼインを基質とし、pH 3.0、37℃において1分間に1.0 μmol のチロシンに相当するフェノール試薬呈色物質の増加をもたらす活性であり、Protease（EC 3.4.24.32）および Subtilisin A の1ユニットは、カゼインを基質とし、pH 7.5、37℃において1分間に1.0 μmol のチロシンに相当するフェノール試薬呈色物質の増加をもたらす活性である。カゼイン溶液の調製には、表1に示したタンパク質分解酵素に適した緩衝液のほか、試薬特級の乳酸（和光純薬工業製）を用いた。

カゼイン由来ペプチドに複合化させたペクチンは、かんきつ類由来ペクチン（和光純薬工業製）

* 食と医薬品研究課

表 1 3種のタンパク質分解酵素と用いた緩衝液

タンパク質分解酵素	Newlase	Protease (EC.3.4.24.32)	Subtilisin A
タンパク質分解酵素添加 ユニット数 (カ価)	100	100	1000
緩衝液	1 N 塩酸	50 mM リン酸緩衝液	10 倍希釈ホウ酸緩衝液

を、エタノール沈殿には変性アルコール（日本アルコール販売製，ソルミックス AP-7）を，粉末化の賦形剤としてマルトデキストリン（ニッシ製，特殊デキストリン N.S.D.500）を用いた。

2. 2 実験方法

2. 2. 1 カゼイン由来ペプチドの調製

表 1 に示した組み合わせで，カゼイン 1 g に緩衝液を加えて全量 100 mL とし，恒温槽で 37 °C に保持した。緩衝液に合わせて 3 種類のタンパク質分解酵素をそれぞれ添加し，酵素添加 0, 30, 60 および 90 分後に 10 mL ずつ採取し，直ちに 10 % (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) を 2 mL 添加して反応を止め，2.3.2 のタンパク質の分解度の測定に供した。なお，タンパク質分解酵素により 90 分間処理したものは凍結乾燥し，次項のカゼイン由来ペプチドとして複合体の調製に使用した。

2. 2. 2 カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の調製

カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の調製は，栗田らの方法⁵⁾を改変して行った。具体的には，2.2.1 項で得られたカゼイン由来ペプチド 1 g に対して，1.5 % (w/v) ペクチン溶液 (pH 6.3 に調整したもの) 250 mL の割合で混和した。ここにペクチン溶液の 2 倍量の変性アルコールを加え，生じた沈殿物を目開き 0.45 mm のふるいで濾して回収した。これを室温にて送風乾燥した後，65 °C

で 48 時間加熱し，カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の塊を得た。

2. 2. 3 カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の大量調製

カゼイン 20 g に，100 倍に希釈した乳酸 500 mL を加えて加温溶解した。室温まで冷却後，37 °C に保ちながら，希塩酸を用いて pH 3.0 に調整した後，Newlase を添加し，蒸留水を加えて全量を 2 L とし，90 分間処理した。これを凍結乾燥し，カゼイン由来ペプチドを得た。カゼイン由来ペプチド 1 g に対し，1.5 % (w/v) ペクチン溶液 250 mL を加え，1 N NaOH を用いて pH 6.0 に調整した。次いで，2 倍量の変性アルコールを加えて生じた沈殿物を，目開き 0.45 mm のふるいで濾して回収し，室温で送風乾燥後，65 °C で 48 時間加熱し，50 % エタノール溶液 1.5 L で 2 回洗浄した。

2. 2. 4 カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の粉末化

2.2.3 項で得られたカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体は，固く凝集しており計量等がしにくいことから，ハンドリングを向上させる目的で粉末化を行った。図 1 に示すように，カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体乾燥物に，賦形剤としてマルトデキストリンを添加し，蒸留水を加えて溶解した後，ミニスプレードライヤー（日本ビュッヒ製，B-290）を用いて噴霧乾燥し，粉末を得た。

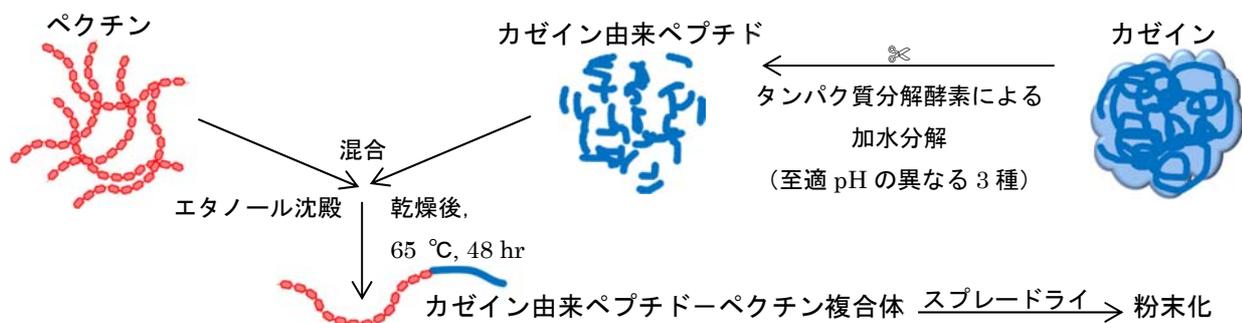


図 1 カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の調製フロー

2. 3 分析

2. 3. 1 アミノ酸分析

ペクチンおよびカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体など、試料中のアミノ酸含量の分析は、塩酸加水分解法により行った。すなわち、試料を6N塩酸で110℃、24時間加水分解し、得られたアミノ酸をポストカラム法⁶⁾により分析した。

(HPLC: 島津製作所製 LC-20A, アミノ酸分析カラム: Shimpack Amino-Na (100 mm L.×6.0 mm I.D))

2. 3. 2 カゼインの酵素による分解度とペプチド鎖長の測定

カゼインの塩酸加水分解物、および3種のタンパク質分解酵素で各々30, 60, 90分処理したカゼイン由来ペプチド溶液100μLに対し、0.1M Na₂B₄O₇の0.1N NaOH溶液(pH 10.1) 3mLを加え、次いで0.2M Na₂SO₃水溶液30μLと0.14M 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(TNBS・Na)水溶液100μLを加え、25℃で20分反応させた後、420nmでの吸光度を測定し、遊離アミノ基を定量した。なお、アミノ基定量用の検量線作成には、グリシンを標準物質として使用した。

この方法によるアミノ基定量の結果を遊離アミノ基数(A)、2.3.1項によるカゼインの全アミノ酸含量を全アミノ基数(B)とみなし、酵素分解度(degree of hydrolysis (DH))および平均ペプチド鎖長(average peptide chain length (PCL))を、以下の式により求めた^{7,8)}。

$$DH = \frac{\text{遊離アミノ基数 (A)}}{\text{全アミノ基数 (B)}}$$

$$PCL = \frac{100}{DH}$$

2. 3. 3 カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の分子量測定

HPLC (島津製作所, LC-10) を用いて、サイズ排除クロマトグラフィーにより分子量を測定し、ペクチンが結合したことを確認した。凍結乾燥したカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体を超純水に溶解し、開孔0.20μmのPTFE膜でろ過した後、分析した。分子量マーカーとして、水溶性多糖であるプルラン(分子量: 5900, 11800, 22800,

47300, 112000) を用いた。分析条件は、カラム: 昭和電工製, Shodex OHpak SB-804HQ 8 mm×300 mm, 移動相: 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.2), 流速: 0.5 mL/min, カラム温度: 30℃, 検出器, サンプル量: 10 μL とした。

3. 結果と考察

3. 1 カゼイン由来ペプチド鎖長の測定

2.2.1項で調製したカゼイン由来ペプチドの平均ペプチド鎖長(PCL)の測定結果を図2に示す。いずれのタンパク質分解酵素の処理においても、PCLは3~6程度であり、Newlaseで処理したペプチドのPCLが最も大きく、Protease (EC 3.4.24.32) と Subtilisin A で酵素処理したペプチドのPCLは、同程度であることがわかった。また、Newlaseは酵素処理時間90分まで処理時間が長くなるほどPCLが短くなるのに対し、Protease (EC 3.4.24.32) と Subtilisin A は、酵素処理時間30分以降PCLはほとんど変わらなかった。

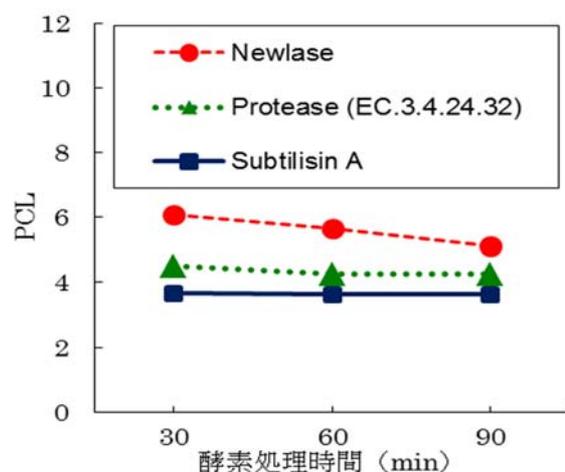


図2 カゼイン由来ペプチドのPCLと酵素処理時間の関係

3. 2 カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体のアミノ酸組成

2.2.2項で調製した3種のカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体、およびペクチンに含まれるアミノ酸含量について、塩酸加水分解法により定量した結果を表2に示す。NewlaseおよびProtease (EC.3.4.24.32), Subtilisin Aを用いて処理したカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の総アミノ酸量は、ペクチンの総アミノ酸量に対して、それぞれ288.5%, 170.5%, 321.5%で

表2 ペクチンおよびカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体のアミノ酸組成の分析結果

アミノ酸含量 (nmol/mg)	ペクチン	タンパク質分解酵素		
		Newlase	Protease (EC.3.4.24.32)	Subtilisin A
アスパラギン酸	2.29	3.65	3.01	5.71
スレオニン	0.39	1.01	1.05	1.84
セリン	0.88	1.96	1.13	2.28
グルタミン酸	0.82	2.11	1.00	2.40
プロリン	0.61	5.44	3.76	5.44
グリシン	1.20	1.31	0.57	1.64
アラニン	0.76	2.28	1.12	2.02
バリン	0.81	1.69	0.86	2.62
メチオニン	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
イソロイシン	0.76	2.57	1.36	2.86
ロイシン	1.23	2.97	1.50	2.65
チロシン	0.45	0.93	0.48	0.94
フェニルアラニン	0.69	1.06	0.72	1.47
ヒスチジン	1.36	3.87	2.23	4.80
リジン	1.75	10.99	5.89	10.29
アルギニン	1.51	2.90	1.77	2.91
総アミノ酸量	15.51	44.74	26.45	49.87

あった。ペクチンよりもカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の構成アミノ酸の総量が多いことから、ペクチンにカゼイン由来ペプチドが結合したことが推測され、Subtilisin A で処理したものが、最も多くペクチンと結合していることが明らかとなった。

3.3 カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の分子量分布

ペクチンおよび3種類のカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体について、サイズ排除クロマトグラフィーで分子量を測定した結果を図3に示す。コントロールのペクチンに比べ、カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体は、溶出時間12分から13分の間においてピーク位置が高分子側にシフトしていることから、ペクチンにペプチドが結合したことが観察された。Subtilisin A で処理したカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の分子量が最も大きいことを確認した。アミノ酸含量の結果を合わせて考えると、Subtilisin A 処理によるカゼイン由来

ペプチド-ペクチン複合体は、アミノ酸含量が多く、分子量ピークが他の酵素処理のものよりも大きいことから、ペプチドのペクチンへの結合量が最も大きいことが推測される。一方、Newlase と Protease (EC.3.4.24.32) については、分子量は同程度であるが、アミノ酸含量はNewlaseの方が多かった。これは、カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体複合体の調製の過程でエタノール沈殿法により回収する際、ペプチドとペクチンを疎水的に結合させることから、ペプチドの疎水度の違いにより、結合効率に影響があったと推測される。

3.4 噴霧乾燥による粉末化

今回は、PCLの大きなNewlaseを用いて調製したカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体溶液およびマルトデキストリンをそれぞれ2.5%含有する溶液(複合体9.02gを含む噴霧溶液360.8g)を調製し、表3に示す条件の下で噴霧乾燥した。その結果、3.35gが粉末として回収できた。

表3の条件では、装置内壁に付着し、回収でき

ない試料が多かったため、より乾燥効率を上げる
 目的で噴霧ガス流量を大きくし、噴霧溶液の粘度

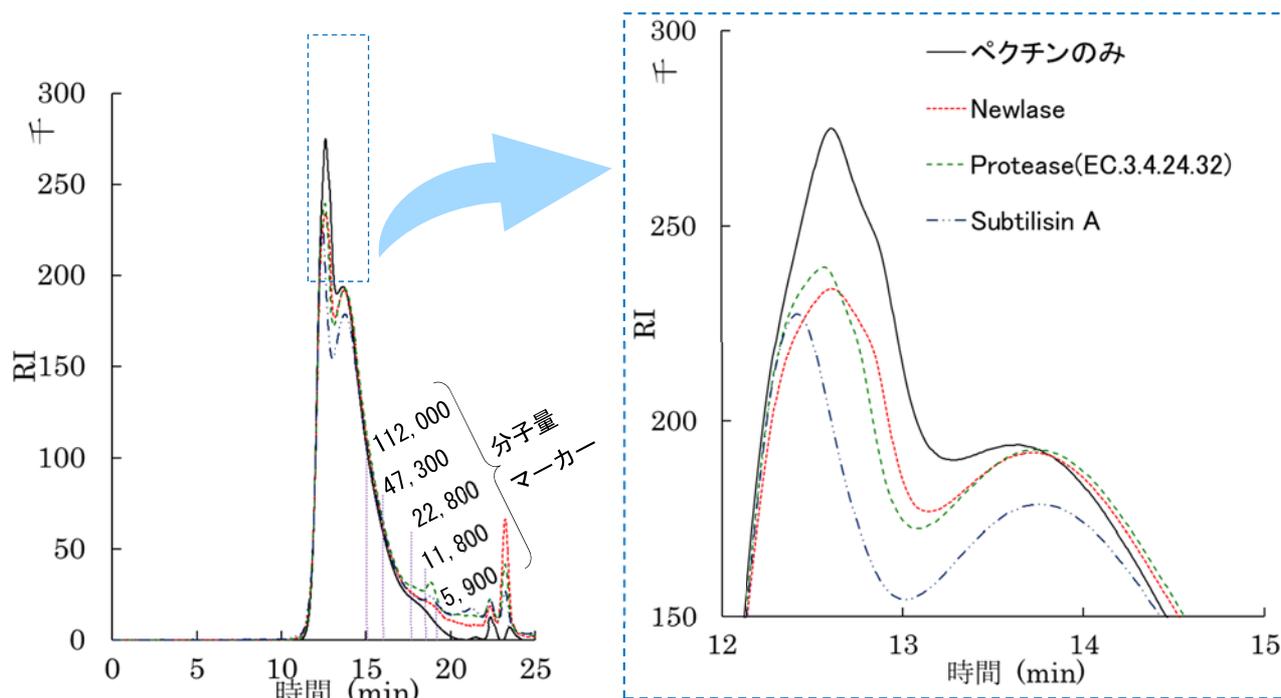


図3 3種類のカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体及びペクチンの分子量分布の測定結果

を下げるために複合体含量を上げて、カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体3%，マルトデキストリンを1%含有する溶液（複合体8.80gを含む噴霧溶液293.5g）を調製し、表4の条件で噴霧乾燥した。その結果、7.84gが回収され、表3の条件よりも回収率が向上した。

表3 スプレードライ条件

入口温度（設定値）	125℃
出口温度（実測値）	77~80℃
試料送液速度	5.2 g/mL
噴霧ガス流量	357 L/hr

表4 スプレードライ条件

入口温度（設定値）	130℃
出口温度（実測値）	69~71℃
試料送液速度	6.1 g/mL
噴霧ガス流量	700 L/hr

本研究では、カゼインを3種のタンパク質分解酵素で処理してペプチドとし、これにペクチンを結合させて新規複合体を調製することができた。それらカゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体は、カゼインの処理に用いたタンパク質分解酵素によって、複合体分子量分布やアミノ酸含量に差があることが認められた。今後は、処理する酵素の基質特異性等の違いにより、様々な特長を持つ新しい機能性素材が開発できることが期待される。また、粉末化の条件を検討した結果、カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体3%とマルトデキストリン1%を含有する溶液を、噴霧ガス流量を大きくし、入口温度を上げて噴霧乾燥することにより、効率的に粉末化できる条件を見出すことができた。

参考文献

- 1) 三重県天然資源活用調査部会：“三重県天然資源活用調査報告書-全県調査結果報告-”．p16 (2010)
- 2) 真部孝明：“ペクチン-その科学と食品のテク

4. おわりに

- スチャー” . 株式会社幸書房, p6-8 (2001)
- 3) 牛乳製品健康科学委員会 : “平成 21 年度牛乳栄養学術研究会委託研究報告書” , p214-229 (2009)
- 4) S. V. Silva et al.: “Caseins as source of bioactive peptides” . International Dairy Journal, Vol. 15, Issue 1, p1-15 (2005)
- 5) O. Kurita et al.: “Chemical modification of citrus pectin to improve its dissolution into water” . Carbohydrate polymers, vol. 87, Issue 2, p1720-1727 (2012)
- 6) M. H. Joseph et al.: “Electrochemical activity of α -phthalaldehyde-mercaptoethanol derivatives of amino acids: Application to high-performance liquid chromatographic determination of amino acids in plasma and other biological materials” . Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, vol. 277, p125-136 (1983)
- 7) 山科孝雄ほか : “2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムによるアミノ基定量の改良法” . Journal of Japan Oil Chemists' Society, vol. 36, Issue 6, p441-443 (1987)
- 8) F. M. Abu-Salem et al.: “Characterization of antioxidant peptides of soybean protein hydrolysate” , World Academy of science, engineering and technology international journal of nutrition and food engineering, vol. 7, No. 7 (2013)
- (本研究は, 法人県民税の超過課税を財源として
います.)