

カゼインペプチド-ペクチンオリゴ糖複合体 の抗酸化活性及び乳酸菌活性化作用

苔庵泰志*, 梅谷かおり*, 山岡千鶴*, 栗田 修*

Antioxidant Property and Lactobacilli Proliferation on Casein Peptide-Oligopectin Complex

Yasushi KOKEAN, Kaori UMETANI, Chizuru YAMAOKA and Osamu KURITA

Casein peptide-oligopectin complexes (CPPO) were prepared and investigated on radical scavenging ability and proliferation for lactic acid bacteria. Casein was proteolysed by using three proteases being different optimum pHs. Pectin was hydrolysed by a pectinase. Casein peptide and pectin were complexed by the use of intramolecular associations in polar organic solvent. The value for radical scavenging ability of the CPPOs treated by the acidic proteases showed the strongest: its value was about 30 % higher than that for peptide free-oligopectin. The complex activated the fermentation ability of *Lactococci*, but inactivated that of the *Lactobacilli*, *E. coli*, and *Enterococcus*.

Key words: Casein hydrolysate, Antioxidant, Lactic acid bacteria

1. はじめに

カゼインは牛乳に含まれる主要なタンパク質で、牛乳の全タンパクの約 80%を占めており、栄養補給はもとより、良好な呈味性、乳化能、カルシウム吸収促進等の多く機能を有することから、食品のみならず医薬品、化粧品の製造に用いられている¹⁾。工業的には、牛乳中でカゼインミセルを形成する各成分の分画製造が可能であることから、食品科学や栄養学分野ではとりわけ注目度が高く、栄養特性や物理特性が最もよく研究されている主要な食品タンパク質の一つである。カゼインの加水分解物であるカゼインペプチド (CP:Casein-peptide) の機能に関しても多くの報告があり、主なものだけでも抗酸化活性、抗炎症作用、抗高血圧、オピオイド作用 (麻薬様作用)、カルシウム吸収促進、抗菌、抗血栓作用、抗菌作用等多岐にわたる²⁾。

一方、デンプンに代表される天然多糖類から加水分解、異性化、転移反応、重合等の反応により、合成したオリゴ糖に関しても、ペプチド同様、様々な機能を有しており、甘味料、う蝕及びビフィズス菌や乳酸菌の増殖因子等の用途で用いられている³⁾。

最近の健康ブームにより様々なサプリメントを複合的に摂取することも流行となっているが、さらに多くの機能を有する素材を開発することで、食品素材としての付加価値が高まる他、使用時の煩雑さを低減することができる考える。そこで本研究では、CP の機能性の一つとして抗酸化活性に注目し、オリゴ糖の乳酸菌増殖作用を複合化した素材の開発を目的として検討を行った。

2. 実験材料と実験方法

2. 1 菌株

Lactobacillus plantarum JCM1055 (乳酸桿菌), *Escherichia coli* JCM105 (悪玉菌) は理化学研究

* 食と医薬品研究課

所バイオリソース研究センター(つくば市, 茨城県)から, *Lactobacillus casei* NBRC3425 (乳酸桿菌), *Lactococcus lactis* NBRC12007, *Streptococcus thermophilus* NBRC13957 (以上乳酸球菌), *Enterococcus faecalis* NBRC12694 (悪玉菌) は独立行政法人製品評価技術基盤機構(かずさ市, 千葉県)から購入した。

2.2 カゼインペプチド (casein peptide, CP) の調製

既報³⁾に従い, 至適 pH (酸性, 中性, アルカリ性) の異なるプロテアーゼ (表 1) を用いて, CP を調製した。カゼインに対してプロテアーゼを酵素: 基質 = 1:4 (w/w) の割合で加え, それぞれの至適 pH に調製し, 37°C で 90 分間処理した。反応液を, 蒸留水に対して透析した後, 凍結乾燥により標品とした。以下 Newlase (酸性プロテアーゼ) 処理品を pH3.0-CP, Protease (EC3.4.24.32, 中性プロテアーゼ) 処理品を pH7.5-CP, Subtilisin A (アルカリ性プロテアーゼ) 処理品を pH9.7-CP として示す。

表 1 ペプチド調製に用いたプロテアーゼ

プロテアーゼ(起源)	至適(pH)	至適温度(°C)
Newlase Rhizopus species	3.0	37
SIGAMA:P-0107 EC 3.4.24.32 Bacillus polymyxa	7.5	37
SIGMA:P-5647 SUBTILISIN A Bacillus licheniformis	9.7	37
ICN:1-800-854-0530		

2.3 カゼインペプチド-ペクチンオリゴ糖複合体 (CPPO) の調製

CP とペクチンの複合体は, 梅谷らの方法に準じて調製した⁴⁾。得られたカゼインペプチド-ペクチン複合体 5 g を蒸留水 500 mL に懸濁した後, pH を 5.8 に調製した後, ペクチナーゼ (1.06 unit/mg) を加え, 攪拌しながら 30°C で 3 時間処理した。15 分間沸騰湯浴中で酵素を失活させた後, 蒸留水に対して透析, 凍結乾燥し, カゼインペプチド-ペクチンオリゴ糖複合体 (casein peptide/pectin oligosaccharide, CPPO) を得た。CP と同様の酵素処理により, ペクチン 5 g を用いてペクチンオリゴ糖を

調製した。以下 newlase (酸性プロテアーゼ) 処理品を pH3.0-CPPO, Protease (EC3.4.24.32, 中性プロテアーゼ) 処理品を pH7.5-CPPO, subtilisin A (アルカリ性プロテアーゼ) 処理品を pH9.7-CPPO として示す。

2.4 培地と培養条件

乳酸桿菌の培養は MRS 培地を用い, 乳酸球菌及び悪玉菌の培養は M17 培地を用い, 培養条件はいずれも 24 時間とし, グローブボックス内の空気を窒素置換して嫌氣的に予備培養, 本培養の順で行った。はじめに, MRS, M17 で 24 時間予備培養の後, 本培養として, CPPO1.0 % (w/v) を添加した培地 (MRS, M17) に, 培養液を 0.1 % (v/v) となるように培地 80 mL に加えて, 48 時間培養した。善玉菌である乳酸菌の活動指標は, 発酵力を表す pH とした。なお, CPPO との菌の生育の違いを評価するために, CPPO を添加しない培地にペクチンオリゴ糖を添加して同様に培養した。悪玉菌は, 600 nm の濁度により生育を評価した。

2.5 アミノ酸分析

ペクチンオリゴ糖, CPPO を塩酸加水分解し, アミノ酸分析を行った。すなわち, 110°C で試料を 6 N 塩酸で 21 時間加水分解し, 陽イオン交換クロマトグラフィーによる各アミノ酸の分離, OPA (o-フタルアルデヒド) を用いたポストカラム誘導体化蛍光検出法により分析した。結果は, 凍結乾燥粉末 1 g 当たりに含まれる遊離アミノ酸量として示した。

2.6 抗酸化活性の測定

ペクチンオリゴ糖, CP 及び CPPO の各凍結乾燥粉末 0.5 g に 80 % エタノール 10 mL を加え, ホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出し, 74,000 × g で 20 分間遠心分離した。得られた上清を試料溶液として, 須田らの分光測定法⁵⁾をプレートリーダーで測定できるように試料溶液量を改変し, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去能を測定し, 抗酸化活性の指標とした。測定値は, 抗酸化剤である Trolox 相当量として算出した。

3. 結果と考察

3.1 乳酸菌発酵及び増殖促進効果

CPPO の添加が乳酸の生育に与える影響について, 表 2 に示す。値は, 培地に何も添加せず菌を培養時の pH 及び濁度を 0 として, CP 及び CPPO を添加して培養したときの相対値として示した (Δ

表 2 CPPO の添加が乳酸及び悪玉菌の生育に与える影響

オリゴ糖の種類		Δ pH *1				Δ OD600 *1	
		乳酸桿菌		乳酸球菌		悪玉菌	
		<i>L.plantarum</i>	<i>L.casei</i>	<i>L.lactis</i>	<i>S.thermophils</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.coli</i>
ペクチンオリゴ糖 *2		0.33	0.28	-0.33	-0.39	-0.36	-0.26
CPPO (分解したプロ テアーゼの至 適pH)*3	3.0	0.33	0.26	-0.32	-0.34	-0.49	-0.86
	7.5	0.32	0.27	-0.31	-0.38	-0.46	-0.91
	9.7	0.34	0.29	-0.29	-0.38	-0.48	-0.78

*1: 培地のみを 0 とした時の相対値

*2: ペクチン酵素分解物

*3: カゼインペプチド-ペクチンオリゴ糖複合体(Casein-peptide/pectin-oligosahaccaride:CPPO) カゼインを至適 pH の異なる 3 種のタンパク質分解酵素を作用させてペプチド調製後, ペクチンと複合化した. その後ペクチナーゼ処理により結合したペクチンを低分子化して調製した.

pH, Δ OD). Δ pH に関しては, 低いほう (-) を乳酸発酵が進んだと判断して, 高いほう (+) を乳酸発酵が抑制されたと判断した. 濁度 Δ OD に関しては, 値の高いとき (+) に増殖が促進されたとして, 値の低い (-) ときを増殖が抑制されたと判断した.

Δ pH に関しては, 乳酸桿菌では菌種 (2 種) や処理した酵素 (3 種) に関係なく, 全ての試験区で発酵抑制効果を示した. これに対して乳酸球菌では, CPPO を添加した試験区全てにおいて, 発酵阻害は示さず, ペクチンオリゴ糖と同等の促進効果を示した. サイレージの中では, 乳酸球菌は初期に立ち上がり増殖発酵した後, その後乳酸桿菌の増殖発酵が活発となり, 長い期間乳酸発酵を担うとしている⁶⁾. このため, 乳酸球菌のみ発酵促進したが, 培養時間をさらに延長した場合, 乳酸桿菌に関しても良好な発酵結果が得られる可能性がある.

Δ OD に関しては, 悪玉菌では, 全ての試験区で増殖阻害を示した. 何らかのオリゴ糖へのペプチド付加により, 菌体内での栄養素分解吸収に係る酵素の阻害等, 増殖抑制作用が働いたためと示唆される.

3. 2 抗酸化活性

アミノ酸分析の結果を図 1 に示す. 総アミノ酸量は, 黒色棒グラフのように pH9.7-CPPO で最も多かった. また, 抗酸化活性は, DPPH ラジカル消去能として図 2 に示す. pH3.0-CPPO が最も高く, その値は pH3.0-CP より約 30 %高かった. pH7.5-CPPO では pH7.5-CP と同等, pH9.7-CPPO では pH9.7-CP より値は大きくなったが, ペクチンオリゴ糖より低くなった. 酸性プロテアーゼ処理以外の試験区での抗酸化活性は, 総じてペクチンオリゴ糖より低くなった.

Bambad⁷⁾らの報告では, 抗酸化活性を有するペプチドは, 分子内にプロリン (Pro) を多く含むことが報告されている. また, カゼイン由来の抗酸化活性ペプチドの多くは, ロイシン (Leu) を分子内に含むという報告もある^{8,9)}. それぞれの総アミノ酸 1 g に含まれる Leu 及び Pro の重量の合計値は, 図 1 の灰色棒グラフのように pH3.0-CPPO が最も大きかった. アミノ酸含量の定量的な結果からも, 抗酸化活性の大きさと各処理区での活性の大きさの順番は一致した. また, この 3 種類の酵素処理物の排除限界クロマトグラフィーの結果⁴⁾から, 分子量分布は, pH3.0-CPPO が最も低分子

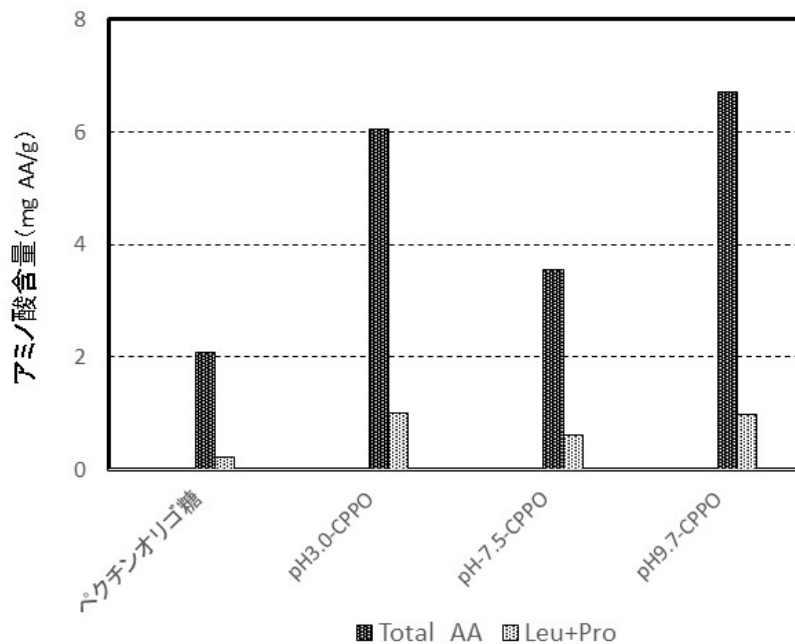


図1 CPPOのアミノ酸含量

Total AA : 総アミノ酸含量 Leu+Pro : ロイシン及びプロリン含量

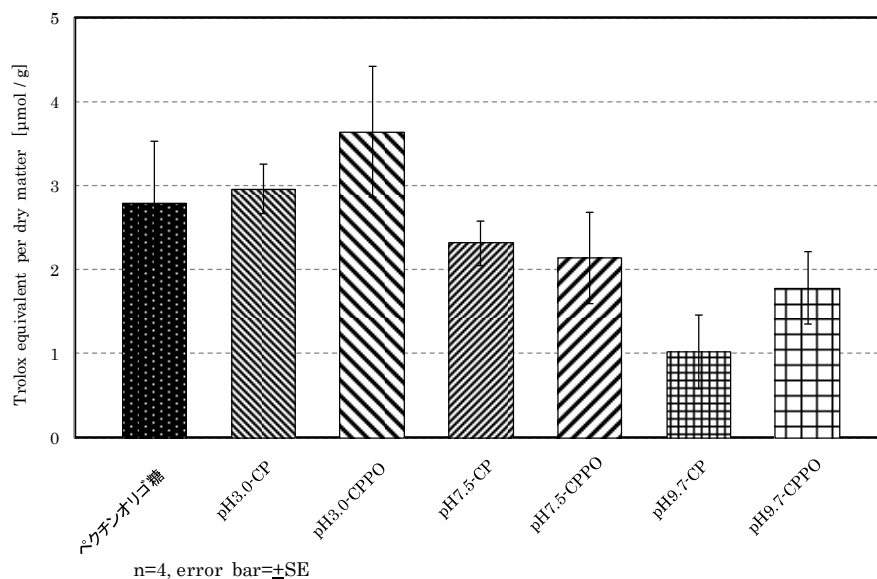


図2 CPPOによるDPPHラジカル消去能の増加

DPPHラジカル消去能：強力な酸化力を有する化合物DPPHの分解活性を評価することで、抗酸化活性を評価。

Trolox equivalent per dry matter [μmol/g] : 1gの乾物当たりのtrolox相当量ペクチンオリゴ糖：ペクチン酵素分解物

CP：カゼインペプチド (casein-peptide), pH 3.0, 7.5, 9.7はそれぞれペプチド調製に用いたプロテアーゼの至適pH

CPPO：Casein-peptide/pectin-oligosahaccaride (カゼインペプチド-ペクチンオリゴ糖複合体)

※DPPH：1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

領域で分布が広いことが既に分かっている。Abu-Salem らの大豆タンパク質を用いた報告¹⁰⁾では、分子量の小さいペプチドほど抗酸化活性は強かったとしている。これらのことから、ペクチンに付加したカゼインペプチド量は pH9.7-CPPO で最も多かったが、分子量分布や含まれるアミノ酸含量により、抗酸化に有効な Leu 及び Pro などのペプチドの生成は pH3.0-CPPO が多く、pH9.7-CPPO, pH7.5-CPPO より抗酸化活性が高くなったと考えられる。

4. まとめ

牛乳由来のタンパク質であるカゼインを、至適 pH の異なる 3 種類プロテアーゼで処理した後、ペクチンに付加し、続くペクチナーゼ処理により CPPO を調製した。CPPO の複合的な生理機能を評価するため、乳酸菌の増殖及び抗酸化活性を測定した。得られた結果は以下のとおりである。

- (1) CPPO は、乳酸球菌に対して発酵促進効果を示したが、乳酸桿菌に対しては効果を示さなかった。一方で、CPPO は悪玉菌に対して、増殖抑制効果を示した。
- (2) 抗酸化活性は、3 つの酵素処理複合体のうち、pH3.0-CPPO で最も強く、次いで pH7.5-CPPO, pH9.7-CPPO の順となった。
- (3) これらのことから、酸性プロテアーゼ処理した CP にペクチンオリゴ糖を付加することで一つの素材で 2 つの機能を有する素材の調製が可能であることが明らかにできた。

今後、得られた素材の活用により、簡便に多機能を付与した食品の開発が期待できる。

参考文献

- 1) 石井哲也：“カゼインミセルの構造及び性質に関する最近の研究動向”。Milk Science 54(1), p1-8(2005)
- 2) S. V. Silva et al.：“Casein as source of bioactive

peptides”。International Dairy J. Sci. Food Agric., 15(1), p1-15 (2005)

- 3) 菅原正義：“オリゴ糖の特性と生理効果”。ビフィズス, 7, p1-12(1993)
- 4) 梅谷かおりほか：“カゼイン由来ペプチド-ペクチン複合体の調製”。平成 29 年度三重県工業研究所研究報告, 42, p62-67(2018)
- 5) 須田郁夫：“食品機能研究法”, 光琳, p218-220 (2000)
- 6) 蔡 又民ほか：“飼料作物・牧草に付着する乳酸菌の分布とその乳酸発酵特性”。日本草地学会誌, 39(4), p420-428(1994)
- 7) F. Bambad et al.：“Anti-inflammatory and antioxidant peptides of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzyme”。Molecules, 22, p609-624 (2017)
- 8) Y. Ren et al.：“Purification and characterization of high antioxidant peptides from duck egg white protein hydrolysates”。Biochim. Biophys. Res. Commun, 452, p888-894 (2014)
- 9) J. Ren et al.：“Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry”。Food Chem., 108, p727-736 (2008)
- 10) F. M. Abu-Salem et al.：“Characterization of antioxidant peptides of soybean protein hydrolysate”。International J. of Nutrition and Food Engineering, 7(7), p522-526 (2013)

(本研究は、法人県民税の超過課税を財源としています。)