

## 酵素処理大豆タンパク質が胆汁酸結合能と高コレステロール食 摂取ラットのコレステロール代謝に及ぼす影響

渡部 緑\*, 大坂隆志\*\*, 沖本喬子\*\*\*, 長尾かおり\*\*,  
坂井智加子, 樋口浩一, 河村大造\*\*\*

Effects of enzymatically-treated soy protein on bile acid binding capacity  
and cholesterol metabolism in rats fed a high cholesterol diet

Midori Watanabe\*, Takashi Oosaka\*\*, Kyouko Okimoto\*\*\*, Kaori Nagao\*\*,  
Chikako Sakai, Kouichi Higuchi and Daizou Kawamura\*\*\*

We attempted to increase the bile acid binding capacity of soy proteins by treatment with the enzymes “Gluc Gin” or rice-koji. We investigated the relationship between bile acid binding capacity in vitro and cholesterol metabolism in rats fed a high cholesterol diet. The bile acid binding capacities of the 2 enzymatically-treated soy proteins were approximately 20% higher than that of the non-treated soy protein.

The excretion of total bile acids in rats had a tendency to increase in the “Gluc Gin” group ( $p < 0.10$ ). However, in the rice-koji group, this tendency was not observed, despite having a bile acid binding capacity similar to that of the “Gluc Gin” group. The intake of enzymatically-treated soy protein did not lower plasma/hepatic cholesterol in rats. Therefore, a relationship between bile acid binding capacity and plasma/hepatic cholesterol level was not detected.

Keyword : soy protein, enzyme treatment, bile acid binding capacity

キーワード : 大豆タンパク質, 酵素処理, 胆汁酸結合能

大豆タンパク質は、乳化性や保水性、起泡性、ゲル形成性といった加工特性に加え、多様な生理機能が期待されているタンパク質素材である<sup>1)</sup>。中でも、血中コレステロール低下作用については多くの研究が行われ、広く知られる生理機能となっており、この効用を謳った大豆タンパク質製品が数多く作られている。

大豆タンパク質の血中コレステロール低下作用は、大豆タンパク質が胆汁酸と結合して体外への胆汁酸排出を促進する結果、胆汁酸の不足分を補うためにコレステロールの異化作用が促進されることによるものとされており、胆汁酸結合能と血中コレステロール低下作用の関連性が示唆<sup>2-4)</sup>されている。そのため、大豆タンパク質の胆汁酸結合能を高めることにより、血中コレステロール低下作用も強まる可能性がある。

そこで、本研究では、大豆タンパク質を酵素処理することにより胆汁酸結合能を高めることを試み、さらに、ラットを用いた動物試験にこれらを供試し、血漿や肝臓中のコ

レステロール濃度並びに糞中への胆汁酸排泄に及ぼす影響について検討したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 供試材料

大豆タンパク質は、不二製油株から提供されたフジプロ-*F*を用いた。

#### 2. 酵素処理

酵素処理は、グルク吟(天野エンザイム製)およびますやみそ(株)で製麴された米味噌用の米麴を用い、酵素分解後の水不溶性画分を採取し、実験に供した。

グルク吟酵素処理は、反応時の酵素濃度が0.5%となるよう予め蒸留水に溶かしたグルク吟溶液を大豆タンパク質に重量比で9倍量加え、攪拌しながら35°Cで5時間処理した。米麴を用いた酵素処理は、米麴に5倍量の蒸留水を加えて4°Cで一夜おき、No.5Bのろ紙でろ過したろ液を大豆タンパク質に重量比で9倍量加え、攪拌しながら50°Cで5時間処理した。各酵素処理後の溶液を5000rpmで30分間遠心分離し、沈殿物を回収した。これらを真空凍結乾燥し、粉碎したものを、グルク吟処理大豆タンパク質および

\* 広島県立総合技術研究所保健環境センター

\*\* 広島県立総合技術研究所畜産技術センター

\*\*\* (元) 広島県立総合技術研究所食品工業技術センター

米麴処理大豆タンパク質として、胆汁酸結合能の測定および動物試験に供した。大豆タンパク質および各酵素処理大豆タンパク質の一般成分値を表1に示した。

### 3. 胆汁酸結合能

胆汁酸結合能は、水野ら<sup>5)</sup>の方法を改変し、グリココール酸との結合能として求めた。すなわち、試料0.5gに1.25mmol/Lのグリココール酸ナトリウム(和光純薬工業製)を含む0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH6.8)15mlを加え、37°Cで2.5時間保温した。その後、6000×gで15分間遠心分離して得られた上清のグリココール酸の濃度をLC/MS(HPLC:Waters e2695, MS:Waters MICROMASS)を用いてグリコデオキシコール酸を内部標準として定量した。この測定条件を表2に示した。反応前後のグリココール酸の濃度差は試料へ結合したことによるものとし、胆汁酸結合能は、試料乾物重量あたりのグリココール酸結含量とした。

### 4. 動物試験

#### (1) 飼料

試験飼料は、大豆タンパク質または酵素処理した大豆タンパク質を10%配合し、さらにコレステロールおよびコール酸ナトリウムを添加した高コレステロール食とした。大豆タンパク質を配合した対照区(以下、SP区)およびグルク吟処理大豆タンパク質を配合した試験区(以下、SPグルク吟区)、米麴処理大豆タンパク質を配合した試験区(以下、SP米麴区)の飼料組成を表3に示した。これらは、AIN-93G<sup>6)</sup>の組成に従って栄養成分値が等しくなるよう調製した。DL-メチオニンおよびコレステロール、コール酸ナトリウムは東京化成工業製、その他の飼料原料はオリエンタル酵母工業製のものを用いた。

#### (2) 実験動物および飼育条件

広島実験動物研究所から購入した5週齢の雄ラット(F344/DuCrIj)15匹を試験に供した。ラットは個別にケージに入れ、温度24±2°C、湿度50±5%、12時間の明暗サイクルに調節した動物飼育室で飼育した。

始めにMF飼料(オリエンタル酵母工業製)を与えて9日間の予備飼育を行い、各試験区のラットの平均体重が等しくなるように5匹ずつ分け、次に各試験飼料を4週間与えた。飼料および水(水道水)は自由摂取とした。

#### (3) 分析方法

ラットの体重は、日曜日を除いて毎日測定した。餌箱交換時に餌箱の重量を測定し、投与時と回収時の重量差を餌

摂取量とした。

血漿総コレステロールは、試験開始時、1週目および4週目に、5時間絶食させたラットの尾静脈を切って直接へマトクリット管で採血し、1100×gで10分間遠心分離して得られた血漿について、コレステロールE-テストワコー(和光純薬工業製)を用いて測定した。

糞は、試験開始後2週目および4週目に、3日間連続して採取した。3日分の糞をあわせ、常温で24時間減圧乾燥を行った後、ミルサーで粉砕した。糞中の総コレステロールおよび総胆汁酸の定量は、Hagioら<sup>7)</sup>の方法を改変して行った。すなわち、粉砕した糞100mgに99.5%エタノールを1ml加えて超音波ホモジナイザー(TAITEC, VP-5S)を用いてサンプルを分散させた。その後、試料分散液を60°Cで30分間加熱してから室温まで冷却し、再び79~80°Cで3分間加熱した後に1600×gで10分間遠心分離後、上清を回収した。残った沈殿物にエタノールを1ml加え、1分間攪拌後、11200×gで1分間遠心分離し、上清を回収する操作を2回行った。回収した上清をあわせて蒸発乾固させ、エタノールに溶解させて4mlに定容した。このエタノール溶液中の総コレステロール濃度および総胆汁酸濃度をコレステロールE-テストワコーおよび総胆汁酸-テストワコー(和光純薬工業製)を用いて測定し、一日あたりの総コレステロールおよび総胆汁酸の糞への排泄量を計算により求めた。

試験終了日には、ラットを5時間絶食させた後、ジェチルエーテル麻酔下で心臓採血により脱血死させた後、速やかに開腹し、肝臓を摘出して重量を測定した。その後、肝臓をポリトロン型ホモジナイザー(IKA labortechnik, T25-S1)により均質化し、Folchら<sup>8)</sup>の方法に従ってメタノール:クロロホルム=1:2で脂質を抽出した。抽出溶媒を留去後、トリトンX-100を10%含むイソプロパノールに溶解し、コレステロールE-テストワコーを用いて肝臓中の総コレステロール量を測定した。

#### (4) 統計処理

得られた値は平均±標準誤差で表し、Tukeyの多重比較法により有意差(p<0.05)の検定を行った。

## 結果および考察

### 1. 大豆タンパク質の酵素処理による一般成分の変化

大豆タンパク質、それを酵素処理して得られた水不溶性

表1 大豆タンパク質及び酵素処理大豆タンパク質の一般成分値

	粗灰分	粗タンパク質	粗脂肪	総食物繊維	糖質
	乾物中%	乾物中%	乾物中%	乾物中%	乾物中%
大豆タンパク質	4.6	87.4	0.1	1.5	6.4
グルク吟処理大豆タンパク質	3.1	84.0	0.1	3.7	9.1
米麴処理大豆タンパク質	2.7	80.0	0.0	2.5	14.8

のグルク吟処理大豆タンパク質および米麴処理大豆タンパク質の一般成分を調べた結果、酵素処理により粗灰分、粗タンパク質が減少し、総食物繊維、糖質が増加した。増加分は酵素由来のものと推測される。

## 2. 大豆タンパク質の酵素処理による胆汁酸結合能の変化

大豆タンパク質の胆汁酸結合能は、 $17.7\mu\text{mol/g-dry}$ であった。グルク吟処理した試料は $21.7\mu\text{mol/g-dry}$ 、米麴処理した試料は $20.6\mu\text{mol/g-dry}$ であり、2種類の酵素処理により胆汁酸結合能は23%および16%上昇した。このことから、酵素処理により大豆タンパク質の疎水性が高まり、胆汁酸との親和性が上昇した可能性が示唆された。

表2 LC/MSの測定条件

カラム	GLサイエンス Inertsil ODS3 (250mm × 2.1mm i.d. 5 μm)
カラム温度	40°C
流量	0.2 ml/min
移動相	A: 40mM 酢酸アンモニウム B: アセトリトリル
移動相濃度勾配	60%B (0min) → 100%B (15min)
注入量	30 μl
イオン化	エレクトロスプレー
コーン電圧	55V

## 3. 動物試験

試験開始時および終了時のラットの体重および摂餌効率を表4に示した。体重と摂餌効率は、各試験区間で有意差は認められず、いずれも順調に発育した。

血漿総コレステロール濃度を表5に示した。高コレステロール食を与えたため、全ての試験区で試験開始後における総コレステロール濃度は開始時よりも高い値を示した。1週目および4週目とも、SP グルク吟区、SP 区、SP 米麴区の順に低値を示したが、いずれも有意差は認められなかった。2で示したようにグルク吟処理大豆タンパク質は、*in vitro*ではこの中で最も高い胆汁酸結合能を示し、動物試験でもSP グルク吟区の血漿総コレステロール濃度が最も低かった。しかし、胆汁酸結合能がグルク吟処理大豆タンパク質よりも20%低い無処理の大豆タンパク質を与えたSP 区の血漿総コレステロール濃度と大きな違いはなく、今回の実験において、胆汁酸結合能と血漿総コレステロールの関連は認められなかった。

肝臓の総コレステロール濃度を表6に示した。総コレステロール濃度は、血漿と肝臓で同様な傾向を示すことが報告<sup>3)</sup>されており、今回の実験でも同様な結果が得られた。

表3 飼料組成

	SP区			SP グルク吟区			SP 米麴区		
	%								
カゼイン	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2
大豆タンパク質	10	-	-	-	-	-	-	-	-
グルク吟処理大豆タンパク質	-	10	-	10	-	-	-	-	-
米麴処理大豆タンパク質	-	-	10	-	-	10	-	-	10
αコーンスターチ	40	40	40	40	40	40	40	40	40
コーンオイル	7	7	7	7	7	7	7	7	7
スクロース	20	20	20	20	20	20	20	20	20
セルロース	4	4	4	4	4	4	4	4	4
DL-メチオニン	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
ミネラル混合物AIN-93G	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合物AIN-93G (重酒石酸コリン入り)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
コレステロール	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
コール酸ナトリウム	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
合計	100.625	100.625	100.625	100.625	100.625	100.625	100.625	100.625	100.625

表4 ラットの体重および摂餌効率

試験区	体重(g)		摂餌効率 (体重増加量g/餌摂取量g)
	開始時	終了時	
SP区	122.5 ± 4.0	236.2 ± 3.8	0.32 ± 0.01
SP グルク吟区	122.2 ± 2.4	231.0 ± 2.4	0.31 ± 0.01
SP 米麴区	122.4 ± 2.3	228.3 ± 2.8	0.31 ± 0.00

表5 血漿総コレステロール濃度

試験区	血漿総コレステロール濃度 (mg/dl)		
	0w	1w	4w
SP区	73 ± 2.4	167 ± 7.6	153 ± 5.7
SP グルク吟区	73 ± 1.5	154 ± 11.5	149 ± 7.3
SP 米麴区	71 ± 1.5	173 ± 8.0	171 ± 2.1

表6 肝臓の総コレステロール濃度

試験区	肝臓総コレステロール濃度 (mg/g Liver)
SP区	25.9 ± 1.2
SP グルク吟区	24.0 ± 1.3
SP 米麴区	28.2 ± 1.6

表 7 総コレステロール及び総胆汁酸の糞への排泄量

	総コレステロール(mg/day)		総胆汁酸( $\mu$ mol/day)	
	2w	4w	2w	4w
SP区	27.0 $\pm$ 1.0	30.3 $\pm$ 1.6	34.5 $\pm$ 2.1	36.9 $\pm$ 1.5
SPグルク吟区	24.3 $\pm$ 1.5	26.4 $\pm$ 0.8	39.4 $\pm$ 1.7	44.4 $\pm$ 2.4
SP米麴区	26.6 $\pm$ 1.4	29.6 $\pm$ 3.7	42.4 $\pm$ 4.7	42.2 $\pm$ 2.2

しかし、いずれの試験区においても有意差は認められなかった。

総コレステロールおよび総胆汁酸の糞への排泄量を表 7 に示した。総コレステロールの排泄量は、2 週目および 4 週目とも、SP 区、SP 米麴区、SP グルク吟区の順に高値を示したが、いずれも有意差は認められなかった。一方、総胆汁酸の排泄量は、4 週目において SP グルク吟区は SP 区より高い傾向を示した ( $p < 0.10$ )。この結果から、グルク吟処理による総胆汁酸の排泄促進効果が示唆された。

今回の実験では、胆汁酸結合能と糞への胆汁酸排泄量の関連が一部示唆されたものの、胆汁酸結合能と血漿総コレステロールとの関連性は認められなかった。菅野ら<sup>3)</sup>は、大豆タンパク質を微生物プロテアーゼあるいは豚ペプシンにより消化して得られた不消化性高分子画分をラットに投与すると、大豆タンパク質よりも血清コレステロール濃度の上昇を抑制したことを報告している。その時の大豆タンパク質の胆汁酸結合能の上昇率は 30%程度であったことから、今回の 20%程度の上昇率では、血漿総コレステロール濃度に有意な違いを生じさせることができない可能性もある。これらの関連性を明らかにするためには、他の酵素処理により異なる胆汁酸結合能の大豆タンパク質を得て、さらに検討する必要がある。

## 要 約

大豆タンパク質の酵素処理による胆汁酸結合能の強化に取り組んだ。さらに、ラットを用いた動物試験により、胆汁酸結合能と血漿や肝臓中のコレステロール濃度並びに糞中への胆汁酸排泄との関連性について調査した。2 種類の酵素処理により胆汁酸結合能は 20%程度上昇したが、血漿や肝臓のコレステロール濃度には影響を及ぼさず、胆汁酸結合能とコレステロール濃度との関連性は認められなかった。また、グルク吟処理した大豆タンパク質は総胆汁酸の排泄を促進する傾向が認められたが、同程度の胆汁酸結合能を有する米麴処理した試料は排泄促進作用が認められなかった。

## 謝 辞

大豆タンパク質を提供していただいた不二製油株式会社様に感謝します。

## 文 献

- 1) 森田雄平, 大豆および大豆蛋白質加工食品の発展とこれらを廻る最近の課題, 大豆蛋白質, 再版, (光琳, 東京), pp.111-116 (2006).
- 2) Iwami, K., Sakakibara, K. and Ibuki, F., Involvement of post-digestion 'Hydrophobic' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1217-1222 (1986).
- 3) 菅野道廣, 後藤章一郎, 山田幸男, 吉田克子, 大豆たん白質の不消化画分のラットにおけるコレステロール低下作用, 大豆たん白質栄養研究会会誌, **10**, 45-48 (1989).
- 4) Higaki, N., Sato, K., Suda, H., Suzuka, Y., Komori, T., Saeki, T., Nakamura, Y., Ohtsuki, K., Iwami, K. and Kanemoto, R., Evidence for the existence of a soybean resistant protein that captures bile acid and stimulates its fecal excretion. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 2844-2852 (2006).
- 5) 水野隆志, 川口きよみ, 篠田粧子, 脱フィチン酸フスマの in vitro におけるリパーゼおよび胆汁酸との結合, 日本栄養・食糧学会誌, **49**, 119-122 (1996).
- 6) Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C.Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *diet. J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).
- 7) Hagio, M., Matsumoto, M., Fukushima, M., Hara, H. and Ishizuka, S., Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS. *Journal of Lipids Research*, **50**, 173-180 (2009).
- 8) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).