

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4096193号
(P4096193)

(45) 発行日 平成20年6月4日(2008.6.4)

(24) 登録日 平成20年3月21日(2008.3.21)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 P 21/06 (2006.01) C 1 2 P 21/06

請求項の数 3 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-554711 (P2003-554711)	(73) 特許権者	503425713
(86) (22) 出願日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		コリア ユニバーシティ ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2005-520499 (P2005-520499A)		韓国 ソウル 136-701, スングブック
(43) 公表日	平成17年7月14日 (2005.7.14)		韓国 ソウル 136-701, スングブック
(86) 国際出願番号	PCT/KR2002/002349		韓国 ソウル 136-701, スングブック
(87) 国際公開番号	W02003/053995	(74) 代理人	100083932
(87) 国際公開日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		弁理士 廣江 武典
審査請求日	平成16年7月14日 (2004.7.14)	(74) 代理人	100121429
(31) 優先権主張番号	10-2001-0078478		弁理士 宇野 健一
(32) 優先日	平成13年12月12日 (2001.12.12)	(72) 発明者	リー, シン-ヒー
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		韓国 ソウル 143-763, クワング
			ジン-グ, ノーユ 2-ドン, ゲウク
			ドン アpartment 1-501

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 燐酸化大豆ペプチドカルシウムおよびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分離大豆蛋白質を0.001～1% (v/v)濃度の燐酸塩を利用して化学的に燐酸化した後、酵素で加水分解して得た燐酸化大豆ペプチドにカルシウムを結合させて遠心分離若しくは透析を利用して精剤分離することを特徴とする燐酸化大豆ペプチドカルシウムの製造方法。

【請求項 2】

分離大豆蛋白質を酵素で加水分解して得た大豆ペプチドを0.001～1% (v/v)濃度の燐酸塩で化学的な燐酸化をさせ、前記で得た燐酸化大豆ペプチドにカルシウムを結合させた後、遠心分離若しくは透析を利用して分離精剤することを特徴とする燐酸化大豆ペプチドカルシウムの製造方法。

【請求項 3】

前記加水分解酵素は、トリプシン(trypsin)、ペプシン(pepsin)、パパイン(papain)で成る群から選択されるいずれか一つであることを特徴とする請求項1または2記載の燐酸化大豆ペプチドカルシウムの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は燐酸化大豆ペプチドカルシウムおよびその製造方法に関し、より詳細には、本発明は大豆から分離した分離大豆蛋白質を加水分解、燐酸化およびカルシウム結合反応させて得た高効率の燐酸化大豆ペプチドカルシウムおよびその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

カルシウムイオンは骨格・細胞および体液中に存在し、神経伝達および筋肉収縮に関与し、成長因子やホルモンなど多様な刺激を細胞内に伝達するなど、幅広い生理作用に関与している人体内で含量が高い元素中の一つである。カルシウムの大部分は骨と歯牙内に磷酸カルシウムの形態で存在するが、年を取りながらカルシウムの吸収率が漸次低減し、これに因り骨にあるカルシウムが離脱して骨多孔症や骨軟化症のような疾病を起こすようになる。

【0003】

人体の消化器内におけるカルシウムの吸収は、水溶性状態で存在するカルシウムにより左右されると考えられている。即ち、酸性を帯びる胃腸内部ではカルシウムが吸収可能なイオン状態に維持されて殆んど大部分が吸収されるが、pHが中性に近い小腸下部では磷(p hosphorous)と不溶性塩を形成して吸収されないまま体外へ排泄される。このような不溶性カルシウムを過量攝取する場合、結石が形成されると考えられている。

10

【0004】

食品のうちでは牛乳中に存在する乳清カルシウムの吸収率が最も高いと報告されている。その理由として牛乳中に存在する乳糖が乳清カルシウムの吸収を促進させるためであると思われるが、最近、牛乳蛋白質の酵素加水分解物質であるホスホペプチド(Phosphopeptide)が人体の消化器内で磷酸カルシウムの形成を抑制するためであるとの理論が提案されている。前記の如きホスホペプチドは消化酵素によりそれ以上分解されずカルシウムイオンと水溶性複合体を成すものと考えられている。

20

【0005】

マンソン(Manson)等はベータ - カゼイン(β -casein)の酵素加水分解物から25個のアミノ酸で成っているホスホペプチドを分離して分析した結果、そのペプチドが4個の磷酸化セリン(phosphoserine)を含んでいるのを明かした(Arch. Biochem. Biophys. 145: 16-26)。このように消化器内でカルシウムとの水溶性複合体を成すのが正にこのホスホペプチドのセリン残基に連結された磷酸基(PO_4^{3-})であるのが明かされることによりカゼインホスホペプチド(casein phosphopeptide)によってカルシウムの溶解性が増加するのはこのペプチドの磷酸基に基因するものと推定されている。また、諸動物実験らによってもホスホペプチドにより可溶性カルシウムの量が増加してその吸収が促進されるとのことが証明された(J. Nutr. 110: 2141-2148, Br. J. Nutr. 49: 67-76)。日本の佐藤等は試験管内の実験により鼠の小腸部分でカゼインホスホペプチドのカルシウム吸収増進効果を現すとのことを明かし出した(J. Nutr. Sci. Vitaminol. 32: 67-76)。

30

【0006】

牛乳に存在するカゼインホスホペプチドの磷酸化はカゼインが小胞体(endoplasmic reticulum)の膜を通過した後、ゴルジ体(golgi complex)に存在するカゼインキナーゼ(casein kinase)により特異的に起こる反応であり(J. Dairy. Sci. 71: 324-336)、現在までカルシウム含有天然食品のうちでは牛乳中のカゼインホスホペプチドが最も効率的に人体内へのカルシウム吸収を促進させるものと明かされた。しかし、カゼインホスホペプチドは牛乳から抽出しなければならないため、限定的な抽出量を向上させなければならないという問題がある。

40

【0007】

従って、カルシウムの結合力と水溶性が増加して体内吸収率が容易でありながらも安全な新しい食品または医薬素材の開発が要求されている。

【0008】

大豆蛋白質は牛乳蛋白質に劣らず普遍化されており、栄養学的に優秀であって優れた経済性を有している。しかし、大豆蛋白質は植物体内で磷酸化が成されないため、カルシウムを含有していないので、カルシウムの主要供給源に成り得なかった。従って、天然大豆蛋白から得たペプチドを効果的に磷酸化してカルシウム結合力と水溶性および体内吸収率が高いカルシウム製剤を開発することは非常に意味があることになる。

50

【 0 0 0 9 】

本発明者達は前記の如き点を勘案して、分離大豆蛋白質を化学的に燐酸化した後、加水分解酵素で加水分解し、または加水分解で得られた大豆ペプチドを燐酸化した後、カルシウム結合反応させることにより燐酸化大豆ペプチドカルシウムを製造分離し、前記燐酸化大豆ペプチドカルシウムのカルシウム結合能力を測定することにより本発明を完成した。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

従って、本発明の目的は分離大豆蛋白質を加水分解、燐酸化およびカルシウム結合反応をさせることにより、高価のカゼインホスホペプチドを代替すると共に効率性の優れたカルシウム製剤を提供することにある。

10

【 0 0 1 1 】

本発明の別の目的は分離大豆蛋白質から最終高効率の燐酸化大豆ペプチドカルシウムを得るまで全工程に対する製造方法と最適条件を提供することであり、加水分解および燐酸化などの部分工程に対する発明とは区分される。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

本発明の前記目的は分離大豆蛋白質を燐酸塩を利用して化学的に燐酸化した後に加水分解酵素で加水分解し、または加水分解で得た大豆ペプチドを燐酸化した後にカルシウム結合反応をさせることにより、燐酸化大豆ペプチドカルシウムを製造分離し、前記燐酸化大豆ペプチドカルシウムのカルシウム結合能力を測定することにより達成した。

20

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 3 】

以下、本発明の構成および作用を説明する。

【 0 0 1 4 】

本発明は分離大豆蛋白質を燐酸塩を利用して化学的に燐酸化した後、加水分解酵素で加水分解し、カルシウム結合反応をさせることにより、燐酸化大豆ペプチドカルシウムを分離する段階；分離大豆蛋白質を加水分解酵素で加水分解した後、燐酸塩を利用して燐酸化してカルシウム結合反応をさせることにより、燐酸化大豆ペプチドカルシウムを分離する段階；前記二つの段階で得た燐酸化大豆ペプチドカルシウムのカルシウム結合能力を測定する段階で構成される。

30

【 0 0 1 5 】

本発明の燐酸化大豆ペプチドは、大豆蛋白質が部分的に切断された大豆ペプチドのセリン残基を含み燐酸化が可能な水酸基(-OH)や(-)電位を有するアミノ酸残基に多量の燐酸基が連結されているものである。

【 0 0 1 6 】

本発明で大豆蛋白質は、各種の蛋白質分解酵素により、または強酸もしくは強アルカリ処理により部分的に切断されうるが、産物の品質均一性を保障し工程所要時間を節約するためにペプシン(pepsin)、トリプシン(trypsin)、アルカラーゼ(Alcalase)、ブロメライン(Bromelain)、パパイン(Papain)、またはニュトラーゼ(Neutrase)などのような蛋白質加水分解酵素を用いるのが望ましい。

40

【 0 0 1 7 】

本発明の大豆ペプチドに燐酸基を共有結合させる過程ではカゼインキナーゼ(casein kinase)などのような各種の蛋白質分解酵素(protein kinases)を用いることもできるが、経済的な面では勿論燐酸化効率を増大させるためにも化学的な方法を適用するのがより有利である。

【 0 0 1 8 】

分離大豆の場合、自体に少量存在する燐酸以外に燐酸の供給源としては燐酸化反応により栄養価の多大な損失なしにも大豆ペプチドの色々な物理化学的な性質を変化させることができる燐酸塩を選択するのが望ましい。

50

【0019】

本発明ではより効率的なカルシウム結合および環境親和型の製品生産のために分離大豆蛋白質を燐酸塩で処理した後に加水分解し、または分離大豆蛋白質を加水分解した後に燐酸塩で処理する製造方法を利用した。

【0020】

本発明で分離大豆蛋白質の燐酸化のための燐酸塩の濃度は0.001～1% (v/v)が望ましい。

【0021】

前記の先燐酸化後に加水分解する前者の方法は、化学的燐酸化剤である燐酸塩を利用して大豆蛋白質を燐酸化させた後、酵素を利用して蛋白質を加水分解させて燐酸化大豆ペプチド(Phosphorylated Soybean Peptide)を分離精剤するのであり、先加水分解後に燐酸化する後者の方法は、工程の順序を異にして大豆蛋白質を先に酵素加水分解し、その加水分解物(hydrolysate)を燐酸化させて製剤するのである。

10

【0022】

以下、本発明の具体的な方法を実施例を挙げて段階別に説明するが、本発明の権利範囲はこれら実施例にのみ限定されるのではない。

実施例1：先燐酸化後に加水分解する製造方法を利用した燐酸化大豆ペプチドカルシウムの分離

分離大豆蛋白を10%濃度で蒸留水に溶かし十分に混合した後、10,000×gで30分間遠心分離して上澄液を得た。分離大豆の自体燐酸基濃度によってそのまま若しくは追加的に燐酸塩(sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, sodium polyphosphateなど)を1% (v/v)濃度で添加して、35℃で3時間反応させた後、塩酸(HCl)溶液を利用して反応物のpHを8.0に調節し、加水分解酵素であるトリプシンを利用して反応物内の酵素に対する基質の比率を異にしながら数時間加水分解した。水酸化ナトリウム(NaOH)溶液を利用して反応物のpHを10.5に調整しながら塩化カルシウムを1%濃度で添加して、常温で1時間カルシウム結合反応させた。

20

【0023】

前記の如き反応が終結した後、残存する燐酸塩(sodium phosphate)と反応副生成物を除去するために遠心分離もしくは透析(dialysis)などにより燐酸化大豆ペプチドカルシウムを分離した。

30

実施例2：燐酸塩の処理濃度を異にした先燐酸化後に加水分解する製造方法を利用した燐酸化大豆ペプチドカルシウムの分離

分離大豆蛋白を10%濃度で蒸留水に溶かし十分に混合した後、10,000×gで30分間遠心分離して上澄液を得た。分離大豆の自体燐酸基濃度によってそのまま若しくは追加的に燐酸塩(sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, sodium polyphosphateなど)を0.001% (v/v)濃度で添加して、35℃で3時間反応させた後、塩酸(HCl)溶液を利用して反応物のpHを8.0に調整し、加水分解酵素であるトリプシンを利用して反応物内の酵素に対する基質の比率を異にしながら数時間加水分解した。水酸化ナトリウム(NaOH)溶液を利用して反応物のpHを10.5に調整しながら塩化カルシウムを1%濃度で添加して、常温で1時間カルシウム結合反応させた。

40

【0024】

前記の如き反応が終結した後、残存する燐酸塩(sodium phosphate)と反応副生成物を除去するために遠心分離もしくは透析(dialysis)などにより燐酸化大豆ペプチドカルシウムを分離した。

実施例3：先加水分解後に燐酸化する製造方法を利用した燐酸化大豆ペプチドカルシウムの分離

分離大豆蛋白を10%濃度で蒸留水に溶かして混合した後、10,000×gで30分間遠心分離して上澄液を得た。前記上澄液を加水分解酵素であるトリプシンを利用して加水分解し、pHを9.0に調整した後、分離大豆の自体燐酸基濃度によってそのまま若しくは追加的に燐酸塩(sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, sodium polyphosphateなど)

50

を1% (v/v)濃度で添加して、35℃で3時間燐酸化反応させた。水酸化ナトリウム(NaOH)溶液を利用して反応物のpHを10.5に調整し、塩化カルシウムを総1%濃度で添加して、常温で1時間カルシウム結合反応させた。

【0025】

前記の如き反応が終結した後、残存する燐酸塩(sodium phosphate)と反応副生成物を除去するために遠心分離もしくは透析(dialysis)などにより燐酸化大豆ペプチド水溶液を分離した。

実施例4：燐酸塩の処理濃度を異にした加水分解後に燐酸化する製造法を利用した燐酸化大豆ペプチドカルシウムの分離

分離大豆蛋白を10%濃度で蒸留水に溶かして混合した後、10,000×gで30分間遠心分離して上澄液を得た。前記上澄液を加水分解酵素であるトリプシンを利用して加水分解しpHを9.0に調節した後、分離大豆の自体燐酸基濃度によってそのまま若しくは追加的に燐酸塩(sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, sodium polyphosphateなど)を0.001% (v/v)濃度で添加して、35℃で3時間燐酸化反応させた。水酸化ナトリウム(NaOH)溶液を利用して反応物のpHを10.5に調整し、塩化カルシウムを総1%濃度で添加して、常温で1時間カルシウム結合反応させた。

【0026】

前記の如き反応が終結した後、残存する燐酸塩(sodium phosphate)と反応副生成物を除去するために遠心分離もしくは透析(dialysis)などにより燐酸化大豆ペプチド水溶液を分離した。

実施例5：カルシウム結合能力の比較

前記実施例から得た燐酸化大豆ペプチドカルシウムのカルシウム結合能力を比較するために、前記実施例1乃至実施例4で得た燐酸化大豆ペプチドカルシウム水溶液にTCA(trichloroacetic acid)を最終10%の濃度で添加し、-20℃で12時間以上放置して沈澱させた後、2,500rpmで30分間遠心分離して上澄液に存在する沈澱物を分離した。550℃で4時間程灰化した後10mL 3N HClで試料を溶かして5%のLa₂O₃と3次蒸留水で希釈した後、原子吸光度計(Atomic Absorption Spectrophotometer)を利用して定量した。収率は〔測定されたカルシウム(結合したカルシウム)の量/添加したカルシウムの量〕を百分率で計算した。測定結果、加水分解後に燐酸化を実施した実施例3および実施例4の試料がもっと高いカルシウム結合能力を現した。その結果を下記表1に示した。

【0027】

(表1)

実施例	結合したカルシウムの比率(%)
実施例1	1.2
実施例2	1.5
実施例3	2.8
実施例4	4.0

燐酸化しなかった大豆ペプチドと燐酸化したもののカルシウム結合度を大豆ペプチドの濃度別に比較した。カルシウム結合能力試験は前記の方法と同一であった。測定結果は表2に示した。燐酸化した大豆ペプチドのカルシウム結合度が燐酸化しなかったものより数等高いのを見せてくれている。

【0028】

(表2)

10

20

30

40

50

大豆ペプチド	I S P 加水分解物の濃度 (p p m)	結合したカルシウム含量 (p p m)
非 燐 酸 化	5 0	1 . 8
	1 5 0	8 . 8
燐 酸 化	5 0	8 . 2
	1 5 0	2 6

10

【産業上の利用可能性】

【0029】

以上、前記実施例により説明した通り、本発明のカルシウム結合能力と水溶性が高い燐酸化大豆ペプチドカルシウムは、生体内吸収率が高いため、食品および製薬産業上非常に有用な発明である。

【図面の簡単な説明】

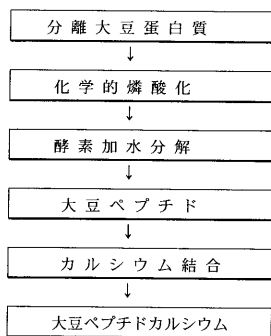
【0030】

【図1】図1は先燐酸化後に加水分解する製造方法を利用した燐酸化大豆ペプチドカルシウムの製造工程を図示したブロック図である。

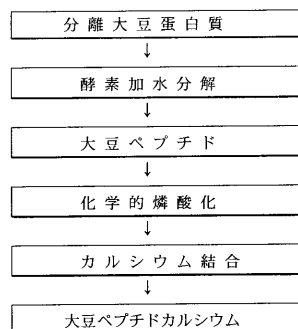
20

【図2】図2は先加水分解後に燐酸化する製造方法を利用した燐酸化大豆ペプチドカルシウムの製造工程を図示したブロック図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 ヤング, ジュング - イク

韓国 ソウル 136 - 075, スングブック - グ, スングブック - ドング, アナム - ドング 5
- ガ, # 1, コリア ユニバーシティ, グラジュエイト スクール オブ バイオテクノロジー

(72)発明者 チョイ, サング - ユン

韓国 ソウル 135 - 270, カングナム - グ, ドゴック - ドング, # 960, ドゴック - ダー
リム アパートメント 102 - 302

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特開平09 - 121812 (JP, A)

J. Food Sci., 1983年 5月, vol.48, no.3, p.716-721

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 21/06

MEDLINE/CA/BIOSIS/

WPIDS(STN)

PubMed

JSTPlus(JDream2)