



Title	Effect of gallic acid on trypsin digestion of bovine milk proteins
Author(s)	Lai, Ping
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27581
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	賴 萍 (Lai Ping)
博士の専攻分野の名称	博 士 (工学)
学 位 記 番 号	第 2 6 1 5 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	Effect of gallic acid on trypsin digestion of bovine milk proteins (没食子酸が牛乳タンパク質のトリプシン消化に与える影響)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村中 俊哉 (副査) 教 授 福崎 英一郎 教 授 藤山 和仁 教 授 紀ノ岡 正博 教 授 大竹 久夫 教 授 原島 俊 教 授 渡邊 肇 教 授 福井 希一 教 授 金谷 茂則 教 授 仁平 卓也 教 授 永井 健治

論 文 内 容 の 要 旨

Chapter 1. General introduction

Phenolic compounds (PCs) are a diverse group of chemicals. They are widely distributed in the plant kingdom and, therefore, commonly found in plant-based foods and beverages. PCs can interact with food proteins, which can be either detrimental or beneficial. Gallic acid (GA) is a natural PC with well-known antioxidant properties. GA is also known to bind with proteins and affect their bioavailability. Since GA is frequently present in foods, the functional properties of foods may be influenced by the interaction of individual food proteins with GA. However, there is little research about the effect of GA on enzymatic digestion process of food proteins and their products. The objective of this study is to determine such effects using model systems. Hence we evaluated the effect of interaction between GA and two bovine milk proteins, β -lactoglobulin (β -LG) and α -casein (α -CN), on their trypsin digestion.

Chapter 2. Effect of gallic acid on trypsin digestion of bovine β -lactoglobulin

In the chapter 2, the effect of GA on trypsin digestion of β -LG was investigated. GA showed no effect on the initial rate of β -LG digestion. However, after 1.5 h of digestion, the observed degree of hydrolysis of β -LG was lower in the presence than that in the absence of GA. The peptides released from β -LG were characterized by liquid chromatography/ion trap-time of flight-mass spectrometry and thirty peptides were identified. In particular, four new peaks were obtained following trypsin digestion of β -LG in the presence of GA. Met⁷, Met²⁴ and Met¹⁴⁶ in the newly appeared peptides were revealed to be quickly oxidized to methionine sulfoxide residues during digestion.

Chapter 3. Effect of gallic acid on trypsin digestion of bovine α -casein

In this chapter, the effect of GA on trypsin digestion of commercial α -CN which contains α_{s1} -CN and α_{s2} -CN, and the peptides released during digestion were investigated. GA showed no effect on the initial

rate of the digestion. However, the apparent degree of hydrolysis achieved its maximum value after 1 h, then decreased in the presence of GA, strongly suggesting that the cross-linking occurred between hydrophobic peptides once released from α -CN by trypsin digestion. In the presence of GA, three peaks derived from α_{s1} -CN disappeared and three new peaks appeared in high-performance liquid chromatography analysis. In these peptides, two Met residues corresponding to Met¹³⁸ and Met¹⁹⁶ in α_{s1} -CN were oxidized to methionine sulfoxide residues. The oxidation of Met¹⁹⁶ was quicker than that of Met¹³⁸. The inhibitory activity of TTMLPW (α_{s1} -CN 193–199) against angiotensin I-converting enzyme (ACE) was reduced slightly by the oxidation of its Met residue.

Chapter 4. Discussion

The reason why the time course of α -CN in the presence of GA gave a maximum value during digestion while that of β -LG did not, might be related to the difference in the ratio of hydrophobic peptides derived from these two proteins, which are easily cross-linked with each other. Met residues in the α_{s1} -CN-derived peptides were oxidized at different time depending on their positions in the peptides.

Chapter 5. General conclusion

In interpreting the findings of the studies, two points are worth highlighting. First, GA showed no effect on the initial rate of β -LG and α -CN trypsin digestion. Second, GA induced two types of reactions on β -LG and α -CN digestion products, cross-linking between hydrophobic peptides and oxidation of Met residues. Moreover, the result of ACE inhibitory assay indicated that Met oxidation might not affect biological properties of TTMLPW. This is the first study showing that GA influenced the profile of peptide-fragmentation and induced Met-residues oxidation during trypsin digestion of proteins, and elucidating that the positions of individual Met residues in the peptides may influence their susceptibility to GA induced Met-oxidation.

論文審査の結果の要旨

一般にポリフェノールと呼ばれる多様なフェノール性化合物は植物由来の食品中に豊富に含まれ、緑茶に含まれるカテキン類に代表されるように、その生理活性によってヒトの健康維持および増進への効果が期待されている。これらのフェノール性化合物にはタンパク質と相互作用するものが知られているが、その相互作用が食品中のタンパク質の消化に与える影響については研究がなされていなかった。本論文では、フェノール性化合物の一種である没食子酸が牛乳に含まれるタンパク質のトリプシン消化に与える影響を解析し、これを初めて明らかにしている。

第1章では緒論として、まず、フェノール性化合物の多様性、没食子酸とその関連化合物について、次に、牛乳に含まれるタンパク質について、続いて、タンパク質とフェノール性の相互作用について、これまでの知見が解説されている。これらの知見、および、数種のフェノール性化合物を用いた予備実験の結果を踏まえ、本論文の目的を、没食子酸が牛乳タンパク質の消化に与える影響を明らかにすることに設定したことが記載されている。

第2章では、牛乳タンパク質として β -ラクトグロブリンに着目している。 β -ラクトグロブリンを没食子酸と共に試験管内にてトリプシン消化に供したところ、 β -ラクトグロブリン単独を消化させた場合と比較して、見かけの加水分解度の低下が観察された。また、LC/IT-TOF-MSにて生じたペプチドを詳細に分析したところ、ペプチド中のメチオニン残基が没食子酸によって酸化されていることが明らかになったことが記載されている。

第3章では、前章で明らかにされた事象が他のタンパク質にも適応されるかを確認するために、牛乳タンパク質である α -カゼインを用いて同様の実験を行った。この結果、 α -カゼインにおいても没食子酸による加水分解度の低下およびメチオニンの酸化が確認された。さらに、メチオニンの酸化はペプチドの配列もしくはタンパク質中の位置特異的に生じることが明らかになった。また、 α -カゼインの消化によって生じる生理活性ペプチドの活性がメチオニンの酸化によっては低下されないことを確認している。

第4章では、第2章および第3章の結果を踏まえた考察が展開されている。これまでの知見より没食子酸は水溶液中でキノン体に酸化されることが予想され、このキノン体がトリプシン消化で生じたペプチド間の架橋を行ったため、見かけの加水分解度の低下が観察されたと考えられている。また、HPLCのプロファイルからこの架橋は特に疎水性のペプチドで顕著に生じていると予想されている。同様にメチオニンの酸化もキノン体との反応によって生じていると

予想されている。これらの結果から、他のフェノール性化合物あるいはタンパク質を用いた研究を推進する必要があると結論づけられている。

第5章では本研究で得られた結果が総括されている。本論文で没食子酸がタンパク質の消化に与える影響、即ち疎水性ペプチドの架橋とメチオニン残基の酸化が初めて明らかにされたことが述べられている。

以上のように、本論文からタンパク質の消化に低分子が影響するという重要な知見が得られ、この知見は食品産業に貢献すると期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。