

# ラクトースおよび乳タンパク質がin vitroでの鉄生体利用効率に及ぼす影響

誌名	日本食品科学工学会誌
ISSN	1341027X
著者	葉, 玉霜 何, 若瑄 李, 丹昂 周, 繼發
巻/号	56巻6号
掲載ページ	p. 331-335
発行年月	2009年6月

## ラクトースおよび乳タンパク質が *in vitro* での 鉄生体利用率に及ぼす影響

葉 玉霜, 何 若瑄\*, 李 丹昂, 周 繼發<sup>§</sup>

東海大学畜産と生物科技学科

\* 稲江大学栄養保健科学学科

Effect of Lactose and Milk Protein on Iron Bioavailability during *in vitro* Digestion

Yi-Ning Yeh, Ruo-Syuan Ho\*, Tan-Ang Lee and Chi-Fa Chow<sup>§</sup>

Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University, No. 181, Sec. 3,  
Taichung Harbor Rd., Situn District, Taichung, Taiwan 407, R.O.C.

\* Department of Nutrition and Health Science, Toko University, No. 51, Sec. 2,  
Hsueh Fu Rd., Pu-Tzu, Chia-Yi, Taiwan 613, R.O.C.

The reduction of ferric ion to ferrous ion and dialyzable iron in lactose solution (4.8, 6.0 and 7.2%), milk protein solution (3.3%), and a combined (lactose-protein) solution containing 250 ppm of FeCl<sub>3</sub> was investigated in connection with iron bioavailability. Each protein solution was adjusted to the following ratios of whey protein to casein (W/C), 0 : 10, 2 : 8, 4 : 6, 6 : 4, 8 : 2, and 10 : 0, and then treated with an enzyme (pepsin, pancreatin-bile salt). Following dialysis of these solutions, the concentrations of ferric and/or ferrous ion, and dialyzable iron were determined. The concentration of ferrous ion was higher in 6.0% and 7.2% lactose solutions than in 4.8% lactose solution. The enrichment of whey protein in the protein solution increased the concentration of ferrous ion and dialyzable ion. In the lactose-protein solution, the concentration of ferrous ion and dialyzable ion was higher at the W/C ratio of 6 : 4 and 7.2% lactose, but lower at 2 : 8 and 4.8%.  
(Received Feb. 8, 2008 ; Accepted Mar. 3, 2009)

**Keywords :** casein, iron bioavailability, lactose, whey protein

キーワード : カゼイン, 鉄生体利用率, ラクトース, ホエータンパク質

鉄は量的にはわずかであるが, 人体にとっては重要な役割を果たしている。日常の食生活で摂取する多くの食品には鉄が含まれているが, 世界的に最もよく見られる栄養失調症は鉄欠乏症であり, 鉄の欠乏は鉄欠乏性貧血を引き起こしやすいことが知られている<sup>1)</sup>。食品に含まれる鉄の吸収効率に影響を及ぼす因子は個人の鉄摂取状態が最も大きい, 摂取される鉄の化学形態も重要であり, 食品の鉄含量を含めて生体利用率を評価することが必要である<sup>2)~4)</sup>。一般の食品中で, 牛乳はヒトの体に必要なあらゆる栄養素がほぼ完璧に含まれている食品といえる。さらに牛乳の組成は人乳に最も近いことなどもあり, 乳児用調製粉乳の主要な原料として利用され, 成長期の乳児や幼児に欠かせない食物供給源となっている。また, 食事における鉄摂取量の増加を目的として, 乳製品への鉄強化の例もあるが, 鉄欠乏問題の有効な解決とはなっていない<sup>5)6)</sup>。

趙<sup>7)</sup>, McMillan<sup>8)</sup>らはヒトによる牛乳の鉄吸収率は人乳や卵, 肉などの動物性タンパク質よりも低いことを報告している。人乳および牛乳に含まれる鉄はいずれも非ヘム鉄であるが, 大人の場合, 人乳の鉄吸収率は牛乳より優れている。また, 乳児の場合にも人乳の鉄吸収率は乳児用調製粉乳よりも優れていることが報告されている<sup>9)10)</sup>。また, 鉄強化牛乳を原料として調製した全粉乳や乳児用調製粉乳では鉄吸収率を高める効果が認められなかった<sup>6)</sup>。さらに, 全粉乳と乳児用調製粉乳の組成についても比較しており, 両者では乳タンパク質のホエータンパク質 (whey protein ; W) とカゼイン (casein ; C) 比 (W/C) およびラクトース濃度で差があり, 牛乳では W/C 20 : 80, ラクトース濃度 4.8% であり, 乳児用調製粉乳ではそれぞれ 60 : 40, 7.2% である<sup>11)</sup>。この組成の違いが鉄強化粉乳における鉄の生体利用率に対して影響を及ぼすことは明らかにされてきたが<sup>12)</sup>, 三者間の比率と鉄の吸収率の間の関係は, 未だ明らかではない。

そこで本研究は, ラクトース-乳タンパク質溶液のラク

〒407 台湾台中市台中港路三段 181 号

\* 〒613 台湾嘉義県朴子市市府路二段 51 号

<sup>§</sup> 連絡先 (Corresponding author), chowfa@thu.edu.tw

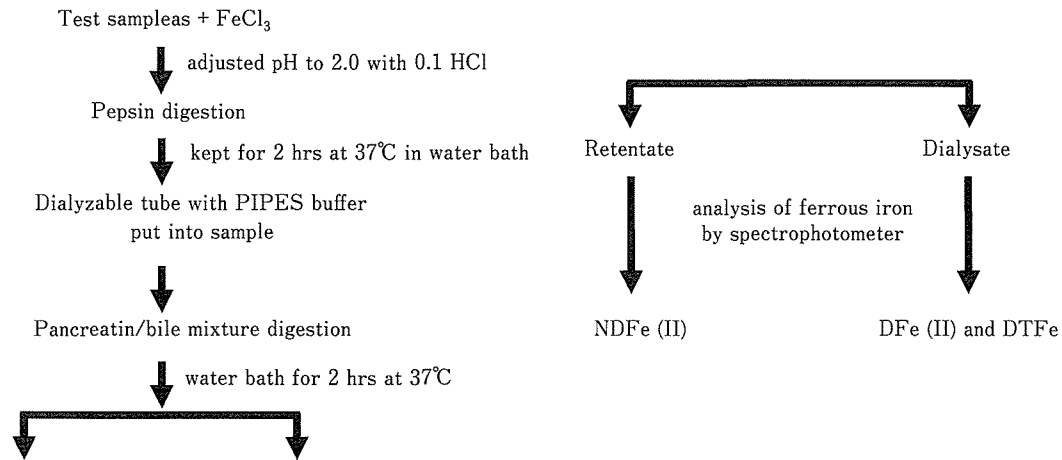


Fig. 1 The flowchart of experiment

トース濃度および W/C を変えて、三価鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) の二価鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) への還元性を調べた。さらに、これらの溶液を酵素 (ペプシン, パンクレアチン-胆汁酸塩) 処理し、透析後の鉄イオンの透過性を調べて、鉄の生体利用効率との関係について考察した。

## 実験方法

### 1. 試験液および混合液の調製

試験液の調製は、ラクトースまたは乳タンパク質 (ホエータンパク質, カゼイン) を脱イオン水に溶解し、ラクトース濃度は 4.8, 6.0 および 7.2% (w/w) とし、乳タンパク質濃度は 3.3% とした。また乳タンパク質溶液の場合、各溶液の W/C 比は 0:10, 2:8, 4:6, 6:4, 8:2, 10:0 (w/w) とした (以下試験液とする)。さらに、ラクトース+乳タンパク質混合溶液 (以下、混合液と略す) は、最終のラクトース濃度および W/C 比は上記と同じにして、18 種類の混合液を調製した。

コントロールには塩化第二鉄水溶液 (片山試薬製) を使用し、鉄濃度 (TFe) を 250 ppm とした。また各試験液には同濃度の塩化第二鉄が含まれる。

### 2. 試験液および混合液の酵素処理および透析

酵素処理および透析は Miller<sup>13)</sup>, 林<sup>14)</sup> の方法に従って実施した。実験の概略を Fig. 1 に示す。各試験液または混合液 20 ml にペプシン溶液 1 ml を添加後、温浴中で 37°C, 2 時間反応を行なった。この反応液にパンクレアチン+胆汁酸塩混合液 5 ml を添加し、PIPES (シグマ製) 緩衝液 20 ml を含む透析チューブ (Cellu. Sep T2 8030-40, 6,000-8,000 MW, Membrane Filtration Products, Inc) を入れた。これらをさらに温浴中で 37°C, 2 時間保持した後、透析外液および内液を得た。

なお、ペプシン溶液はペプシン (メルク製) 4 g を 0.01 N 塩酸 100 ml に溶解し、パンクレアチン+胆汁酸塩混合液はパンクレアチン (シグマ製) 0.5 g および胆汁酸塩 (シグマ

製) 3.0 g を 0.01 N 炭酸水素ナトリウム溶液 100 ml に溶解し、酵素液として使用した。

### 3. 透析液の処理

透析内液 2 ml にタンパク質沈澱還元溶液 1 ml を添加し、室温で一晩放置し、溶液中の三価鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) を二価鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) に還元した。この溶液を 3000 rpm, 15 分間遠心分離した後、その上清の鉄濃度を測定し、透析内液の全鉄濃度 ( $\text{innerFe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$ ) とした。

また透析外液および内液 2 ml にタンパク質沈澱溶液 1 ml を添加し、上記のとおり処理した後、その上清を用いて鉄濃度を測定し、透析外液および内液の二価鉄イオン濃度 ( $\text{outerFe}^{2+}$  および  $\text{innerFe}^{2+}$ ) とした。

なお、タンパク質沈澱還元溶液はトリクロ酢酸 (TCA, 片山試薬製) 10 g, 塩酸ヒドロキシルアミン (石津試薬製) 5 g および濃塩酸 10 ml を脱イオン水に溶解して 100 ml 定容にした。また、タンパク質沈澱溶液は塩酸ヒドロキシルアミンを添加せず、そのほかはタンパク質沈澱還元溶液と同様に調製した。

### 4. 各透析液の鉄濃度の測定

各上清 1 ml に HEPES (シグマ製) 緩衝液 2 ml および  $\text{Fe}^{2+}$  発色液 0.25 ml を加え、混合した。約 30 分間放置後、分光光度計 V-530 (Jasco) により 510 nm の吸光度を測定し、予め作成した  $\text{Fe}^{2+}$  の標準曲線から各透析液の鉄濃度 (ppm) を求めた。なお、 $\text{Fe}^{2+}$  発色液は、バソフェナントロリン (林試薬製) 0.25 g を 0.1 N 塩酸 100 ml に溶解して調整した。

これらの値から試験液の全鉄濃度 (TFe) に対する透析内液全鉄 ( $\text{innerFe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$ ), 透析内液二価鉄イオン ( $\text{innerFe}^{2+}$ ), 透析外液二価鉄イオン ( $\text{outerFe}^{2+}$ ) および透析内液+外液二価鉄イオン ( $\text{innerFe}^{2+} + \text{outerFe}^{2+}$ ) 濃度の比率 (%) を算出した。

$$\text{DTFe}(\%) = [\text{inner}(\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+})] / [\text{TFe}] \times 100$$

$$\text{DFe(II)}(\%) = [\text{innerFe}^{2+}] / [\text{TFe}] \times 100$$

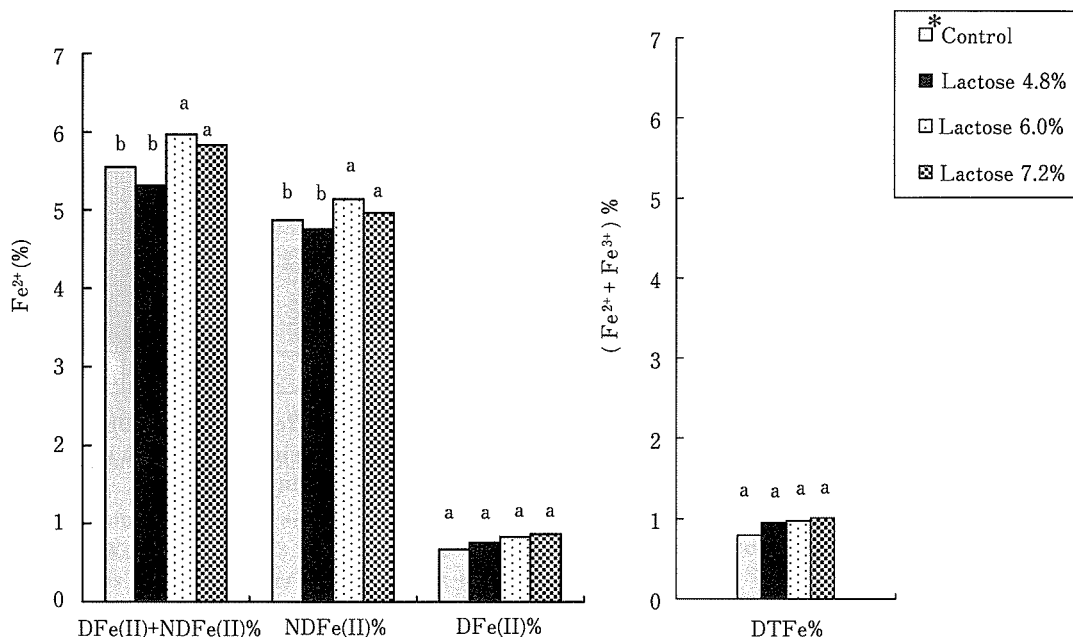


Fig. 2 The percentages of total ferrous iron (DFe (II)+NDFe (II)), non-dialysable ferrous iron (NDFe (II)), dialyzable ferrous iron (DFe (II)) and dialyzable total ferrous iron (DTFe) to total iron in the lactose solution with different concentration of lactose after the treatment with pepsin and pancreatin/bile mixture

\* Control and each lactose solution contain 250 ppm of FeCl<sub>3</sub>.

<sup>a-b</sup> Means significantly different to each other (*P*<0.05).

$$\text{NDFe(II) (\%)} = \frac{[\text{outerFe}^{2+}]}{[\text{TFe}]} \times 100$$

$$\text{DFe(II) + NDFe(II) (\%)} = \frac{[\text{innerFe}^{2+} + \text{outerFe}^{2+}]}{[\text{TFe}]} \times 100$$

### 5. 統計処理

この研究結果の平均値は Statistical Analysis System (SAS, 1999) の Duncan's new multiple range test<sup>15)</sup> を用いて、有意差 (*p*<0.05) の検定を行った。

### 実験結果および考察

Slatkavitz ら<sup>16)</sup> は鉄生体利用効率は Fe<sup>2+</sup> が小腸粘膜に接近するときの濃度関数として示すことが可能で、Fe<sup>2+</sup> 濃度の増加とともに吸収率が高くなると報告している。Miller ら<sup>13)</sup> が提案した鉄生体利用効率の評価を参考にし、本実験では試験液中のラクトース濃度および乳タンパク質の W/C の相違による Fe<sup>3+</sup> の Fe<sup>2+</sup> への還元性を調べ、さらに酵素処理液の透析後における鉄イオンの透析性を調べた。これらの結果から鉄の生体利用効率との関係について検討した。

#### 1. ラクトース濃度の相違による三価鉄イオンの還元性および透析性への影響

4.8%, 6.0% および 7.2% ラクトース溶液における DFe(II)+NDFe(II), NDFe(II), DFe(II) および DTFe の濃度を Fig. 2 に示した。6.0% および 7.2% ラクトース溶液の DFe(II)+NDFe(II), NDFe(II) は 4.8% ラクトース濃度およびコントロールより高い値を示した。この結果から、ラクトース濃度は 7.2% の方が 4.8% より鉄の還元性が優

れていることが示唆される。

Abrams<sup>17)</sup>, Amine<sup>18)</sup> らはラクトースはカルシウムと結合しやすく、ヒトの小腸でカルシウムの吸収を助ける性質があることを報告した。したがって、鉄にもこのような形でラクトースと結合し、ヒトでの鉄吸収率を高めることが推測される。しかしながら、各ラクトース濃度における DFe(II) と DTFe をコントロールと比較しても明らかな差は見られなかった。この場合、ラクトース濃度が 7.2% より高いと、DFe(II) と DTFe に差が生じることも考えられたが、このような高いラクトース濃度は市販粉乳として現実的でないため、今回の実験では特に採用しなかった。しかしながら、ラクトース濃度を 4.8% から 7.2% に増加させることによって、小腸において二価金属イオンの吸収が促進されることが推測されたため、鉄強化市販全粉乳の摂取によって鉄の生体利用効率も改善される可能性があると考えられた。

#### 2. 酵素処理後の乳タンパク質溶液における透析後の二価鉄イオンの透析性

DFe(II)+NDFe(II), NDFe(II), DFe(II) および DTFe 濃度について、W/C 比率による影響を観察し、Fig. 3 に示した。図から明らかなように、ホエータンパク質の比率が大きいほど、これらの値が高くなり、試験区間で顕著な差が見られた。このことから、ホエータンパク質含量が増加すると、Fe<sup>3+</sup> が Fe<sup>2+</sup> へ還元されやすくなり、また DFe(II) と DTFe 濃度も増加することが明らかとなった。しか

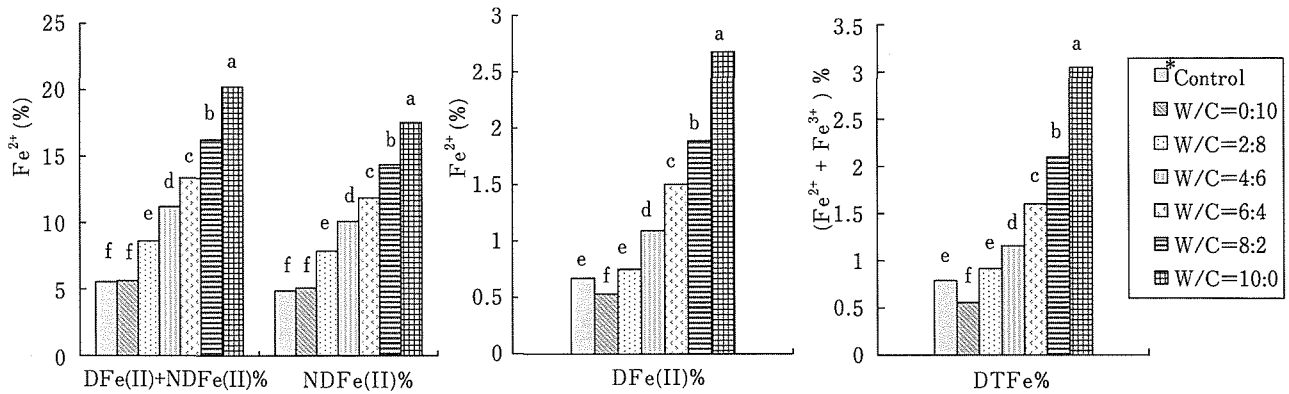


Fig. 3 The percentages of total ferrous iron (DFe (II)+NDFe (II)), non-dialysable ferrous iron (NDFe (II)), dialyzable ferrous iron (DFe (II)) and dialyzable total ferrous iron (DTFe) in 3.3% protein solution with different ratios of whey protein (W) to casein (C) after the treatment with pepsin and pancreatin/bile mixture

\*Control and each protein solution contain 250 ppm of  $\text{FeCl}_3$ .

<sup>a-f</sup>Means significantly different to each other ( $P<0.05$ ).

しながらコントロールと各試験区を比較した結果、W/C 0:10 の DFe(II)+NDFe(II) と NDFe(II) に差は認められず、DFe(II) と DTFe はコントロールより著しく低かった。この原因として、ホエータンパク質とカゼインを加水分解した場合、ホエータンパク質はカゼインよりも還元力を有する含硫アミノ酸と低分子量のペプチドが生成されやすく、この還元力により  $\text{Fe}^{3+}$  の  $\text{Fe}^{2+}$  への還元が高まり、また還元された  $\text{Fe}^{2+}$  とこれら低分子量の加水分解物が結合し、アルカリ環境下で安定な可溶性化合物を保ちつづけると推測した。

Fig. 4 は各比率 (W/C) における DFe(II)/DTFe を示したものである。この比率 (DFe(II)/DTFe) は外因性鉄の生体利用効率の指標となるが、W/C 2:8 の時に非常に低い値を示したが、他の比率ではコントロールより著しく高い値を示した。また W/C 0:10 では DFe(II) と DTFe は低かったが (Fig. 3)、DFe(II)/DTFe は逆に高かった。このことからカゼインのみ (W/C 0:10) の場合には透析性  $\text{Fe}^{2+}$  が多いことが明らかとなった。一方、W/C 2:8 の DFe(II)/DTFe は最も低い値を示したが、これは透析性  $\text{Fe}^{3+}$  が多いためであると考えられた。

以上の結果をまとめると、塩化第二鉄の還元性および透析性はホエータンパク質の比率が増加すると高まった。一方牛乳の W/C 比 (2:8) と同じ乳タンパク質混合液では、DFe(II)/DTFe の値は低い値を示し、このことは透析性総鉄中で高い生体利用効率の  $\text{Fe}^{2+}$  (DFe(II)) 含量は低いことを意味している。この結果より、W/C 比が鉄の生体利用効率に関与している可能性も考えられた。

### 3. 酵素処理後のラクトース-乳タンパク質溶液における透析後の二価鉄イオンの透析性

各種濃度のラクトースおよび乳タンパク質の混合液の DFe(II)/DTFe の関係について Fig. 5 に示した。この図から明らかなように、W/C 6:4 の 7.2% ラクトース溶液で

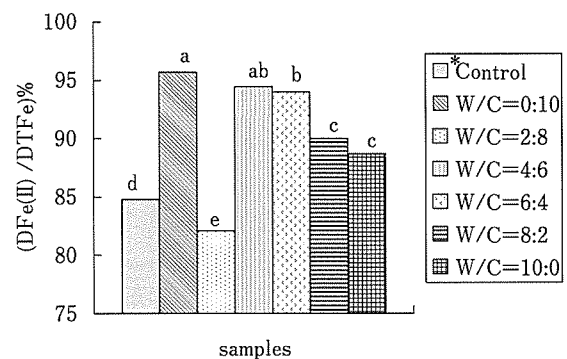


Fig. 4 The percentages of ferrous iron (DFe (II)) to total iron (DTFe) in the dialyzates of 3.3% protein solution with different ratios of whey protein (W) to casein (C) after the treatment with pepsin and pancreatin/bile mixture

\*Control and each protein solution contain 250 ppm of  $\text{FeCl}_3$ .

<sup>a-c</sup>Means significantly different to each other ( $P<0.05$ ).

は、全体的に最も優れており、W/C 2:8 の 7.2% ラクトース溶液では、最低であった。このことから乳児用調製粉乳の各成分の比率は鉄生体利用効率が最も高い混合比率であることが示唆された。これは、McMillan *et al.*<sup>8)9)</sup> の報告でも母乳栄養児の鉄吸収率は牛乳より高いという結果と一致している。また W/C 2:8 の 4.8% ラクトース溶液における DFe(II)/DTFe は高い値ではなかったことから (Fig. 5)、鉄強化を目的とした全粉乳では、乳タンパク質とラクトースの混合比率を乳児用調製粉乳の比率へ調整すれば、優れた鉄生体利用効率が期待できることが示唆された。ただし、飲用時の高ラクトース濃度が乳糖不耐症を起こす点については今後検討する予定である。

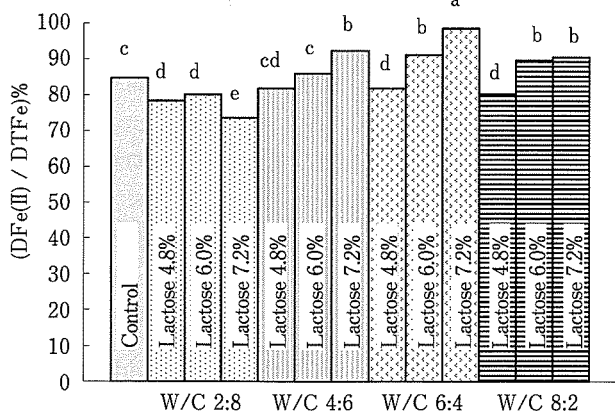


Fig. 5 The percentages of ferrous iron (DFe (II)) to total iron (DTFe) in the dialyzates of 3.3% protein solution with different ratios of whey protein (W) to casein (C) and different concentrations of lactose after the treatment with pepsin and pancreatin/bile mixture

Control and each protein-lactose solution contain 250 ppm of  $\text{FeCl}_3$ .

<sup>a-c</sup> Means significantly different to each other ( $P < 0.05$ ).

## 要 約

鉄の生体利用効率に関連して、ラクトース溶液（4.8%、6.0%および7.2%）およびホエータンパク質（W）とカゼイン（C）比率（W/C）の異なる3.3%乳タンパク質溶液ならびにこれらの混合液を透析し、塩化第二鉄の還元性および鉄の透析性を調べた。W/Cは0:10、2:8、4:6、6:4、8:2および10:0とし、タンパク質は酵素（ペプシンおよびパンクレアチン-胆汁酸塩）処理を行なった。

(1) 6.0%および7.2%ラクトース溶液では、三価鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) の二価鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) への還元性は、コントロールおよび4.8%ラクトース溶液より高かった。一方、4.8%~7.2%ラクトース溶液中の鉄の透析性には差が認められなかった。

(2) W/Cの異なる乳タンパク質溶液では、 $\text{Fe}^{2+}$  および透析性鉄がホエータンパク質比率の増加とともに高まった。

(3) ラクトース-乳タンパク質混合液では、W/C 6:4およびラクトース7.2%で $\text{Fe}^{2+}$ 、透析性鉄ともに最高になった。しかし、牛乳の組成に近いW/C 2:8およびラクトース4.8%では向上が認められなかった。

## 文 献

1) Tapiero, H., Gate, L. and Tew, K.D., Iron : deficiencies

and requirements. *Bio.Pharm.*, 55, 324-332 (2001).

- 2) Carpenter, C.E. and Mahoney, A.W., Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 31, 333-367 (1992).
- 3) Patrick, J., Types of iron fortificants : elemental sources. In "Iron Fortification of Foods," 1<sup>st</sup> ed. Clydesdale, F.M. and Wiemer, K.L. (Academic Press, Orlando, FL), pp. 31-38 (1985).
- 4) 佐藤千鶴子, 安井明美, 小麦胚芽に含まれる鉄の溶出挙動について, 道衛研所報, 40, 100-102 (1990).
- 5) Richardson, D.P., Food fortification. *Proc. Nutr. Soc.*, 49, 39-50 (1990).
- 6) Chang, M.L., Perng, J.F. and Shaw, N.S., Bioavailability of iron from commercial milk powder fortified with both calcium and iron. *Nutr. Sci. J.*, 23, 251-264 (1998).
- 7) Chao, C.H., Yeh, Y.S., Lin, D.M. and Chow, C.F., The effect of animal protein on the *in vitro* bioavailability of iron. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.*, 34, 107-116 (2005).
- 8) McMillan, J.A., Oski, F.A., Louri, G., Tomarelli, R.M. and Landaw, S.A., Iron absorption from human milk, simulated human milk, and proprietary formulas. *Pediatrics*, 60, 896-900 (1977).
- 9) McMillan, J.A., Landaw, S.A. and Oski, F.A., Iron sufficiency in breast-fed infants and the availability of iron from human milk. *Pediatrics*, 58, 686-691 (1976).
- 10) Saarinen, U.M. and Siimes, M.A., Iron absorption from breast milk, cow's milk, and iron-supplemented formula : an opportunistic use of changes in total body iron determined by hemoglobin, ferritin, and body weight in 132 infants. *Pediatr. Res.*, 13, 143-147 (1979).
- 11) Wells, J.C.K., Nutritional considerations in infant formula design. *Semin Neonatol*, 1, 19-26 (1996).
- 12) Gaucheron, F., Iron fortification in dairy industry. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 403-409 (2000).
- 13) Miller, D.D., Schriber, B.R., Rasmussen, R.R. and Campen, D.V., An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 2248-2256 (1981).
- 14) Lin, D.M., Lee, T. A., Yeh, Y.S. and Chow, C.F., Selection and evaluation of the *in vitro* bioavailability of iron compounds in fortified milk powder. *Taiwanese J. Agr. Chem. Food Sci.*, 45 (3), 155-162 (2007).
- 15) Stell, R.D.D. and Torrie, J.H., Principles and procedure of statistic. A biometrical approach. (McGraw-Hill New York), p. 862 (1980).
- 16) Slatkavitz, C.A. and Clydesdale, F.M., Solubility of inorganic iron as affected by proteolytic digestion. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47, 487-495 (1988).
- 17) Abrams, S.A., Griffin, I.J. and Davila, P.H., Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-free infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, 442-446 (2002).
- 18) Amine, E.A. and Hegsted, D.M., Effect of dietary carbohydrates and fats on inorganic iron absorption. *J. Agr. Food Chem.*, 23, 204-208 (1975).

(平成 20 年 2 月 8 日受付, 平成 21 年 3 月 3 日受理)