

研究論文

小豆煮汁に含まれるタンパク質のリン酸カルシウムによる 効率的回収技術の開発と回収タンパク質の活用

石原那美*¹、永井あゆみ*¹、近藤徹弥*¹

Efficient Recovery of Proteins in Waste Water Produced during Adzuki Paste Manufacturing Using Calcium Phosphate

Nami ISHIHARA*¹, Ayumi NAGAI*¹ and Tetsuya KONDO*¹

Food Research Center*¹

豆類の加工工程で排出される大量の浸漬水や煮汁は、豆類由来のタンパク質、糖類、有機酸などの有用成分を含むにもかかわらず、大部分が廃液として処理されている。そこで本研究では、タンパク質高吸着性リン酸カルシウム（CAP）を用いて、小豆煮汁からタンパク質を効率的に吸着回収する技術の開発を目指した。CAPの選択や吸着条件の最適化を図った結果、小豆煮汁からタンパク質を80%以上吸着回収することができた。回収したタンパク質やそのプロテアーゼ処理液には、アンジオテンシン変換酵素阻害活性とトリプシン阻害活性が認められた。

1. はじめに

餡、豆腐、味噌、納豆などの豆類加工食品の製造現場では、豆類を浸漬・煮熟する工程で大量の浸漬水や煮汁が発生し、大部分が廃液として処理されている。これらの豆類加工廃液は多量の有機物を含むため、活性汚泥法などの排水処理を行う必要がある。しかし、昨今の環境基準の規制強化に伴う排水処理のコスト増は、食品製造企業の大きな負担となっている。一方、豆類加工廃液には、豆類に含まれる水溶性のタンパク質、糖類や有機酸などの有用成分が多量に含まれており、機能性食品素材や調味食品素材としての活用が期待できる。これらの有用成分の回収・活用技術の開発は、環境汚染防止はもとより、食糧資源の有効活用の点からも極めて重要である。

小豆煮汁に含まれる機能性成分として最も注目されているのはポリフェノールであり、小豆煮汁中のポリフェノールの回収法や回収したポリフェノールの生理機能に関する多くの研究や特許がある^{1)~3)}。一方で、小豆は大豆に次いでタンパク質含有量が多く（約20%）、煮汁にもタンパク質が溶出している。しかし、小豆タンパク質の機能性に関する研究は大豆に比べてほとんど行われていない。

そこで本研究では、リン酸カルシウム（CAP）を用いて、小豆煮汁中に含まれるタンパク質を効率的に吸着回収する技術を開発するとともに、回収したタンパク質の機能性（抗酸化活性、血圧上昇抑制活性及びトリプシン

阻害活性）の有無を分析した。

2. 実験方法

2.1 小豆煮汁の調製

図1の製餡工程に従って2種類の小豆煮汁（洗切り水、煮上げ水）を調製した。調製した小豆煮汁は、小豆100gあたり、洗切り水は約700ml、煮上げ水は約430mlであった。

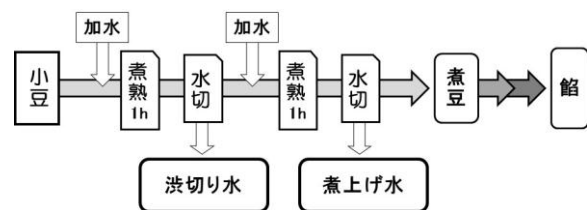


図1 製餡工程

2.2 リン酸カルシウム（CAP）の調製

タンパク質吸着材として、カルシウム塩（Ca 塩）、リン酸塩（P 塩）、炭酸塩（C 塩）を様々な混合比で配合し、調製した合計11種類のCAPを用いた。表1にCAPの比表面積、リゾチーム（LYZ）及び牛血清アルブミン（BSA）の吸着量を示した。

2.3 CAPへの小豆煮汁タンパク質の吸着試験

CAPへ小豆煮汁タンパク質を各種条件（CAPの種類、量、温度、時間）下で吸着させた。すなわち、1mlの小

*1 食品工業技術センター 分析加工技術室

表 1 CAP の比表面積及びタンパク質吸着特性

CAP	Ca塩/P塩/C塩 配合モル比	比表面積 (m ² /g)	LYZ吸着量 (mg/g)	BSA吸着量 (mg/g)
CAP1	10/6/4	61.6	33.0	50.0
CAP2	10/6/1	20.7	22.5	36.1
CAP3	10/6/2	39.9	37.5	52.1
CAP4	10/6/8	96.8	61.8	24.3
CAP5	1/6/4	64.6	57.3	26.9
CAP6	5/6/4	63.8	45.2	62.5
CAP7	20/6/4	51.3	39.5	48.7
CAP8	10/3/4	59.5	61.2	17.2
CAP9	10/7/4	55.5	34.9	60.2
CAP10	10/10/4	66.8	33.1	47.5
CAP11	6/4/2	89.5	24.6	64.9

豆煮汁に 1~30% (w/v) の CAP を加え、温度 4~80°C、吸着時間 15 分~16 時間において、吸着試験を行った。遠心分離により CAP 沈殿物と上清（非吸着画分）に分離した。

2.4 CAP からの小豆煮汁タンパク質の回収

CAP 沈殿物に蒸留水を 1ml 加えて、懸濁させ、遠心分離後、上清を除去した。この洗浄操作を 3 回繰り返した。次に、タンパク質溶出のため、各種溶離液を 1ml 加えて、懸濁させた。遠心分離後、上清を採取した。この溶出操作を 4 回繰り返して、上清を集めた後、分画分子量 3500 の透析膜を用いて蒸留水にて 1 晩透析した。透析内液を凍結乾燥後、1ml の 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) に溶解し、回収液とした。

2.5 分析法

非吸着画分と回収液中のタンパク質の定量には、Bradford法を用いて行った。タンパク質の解析は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用いて行った。泳動後、CBB染色により、タンパク質を検出した。

2.6 回収タンパク質の機能性分析

回収液に各種プロテアーゼを加え、各種プロテアーゼの最適温度で 4 時間インキュベートし、プロテアーゼ処理液を得た。プロテアーゼとして、プロテアーゼ N、S、パパイン（以上、天野エンザイム（株）製）、ズブチリン、トリプシン（以上、Sigma 製）を用いた。回収液及びプロテアーゼ処理液を分析試料とした。

抗酸化活性は、1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) の退色を測定し、Trolox 相当量として算出した⁴⁾。血圧上昇抑制活性は、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を測定し、指標とした⁵⁾。トリプシン阻害活性は、トリプシンによる N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (Sigma 製) の加水分解活性を 405nm における吸光度の増加により測定し、試料添加による反応阻害率を算出した⁶⁾。

3. 実験結果及び考察

3.1 小豆煮汁中のタンパク質の解析

SDS-PAGE 解析の結果 (図 2)、「洗切り水」では分子量約 20kDa 未満のタンパク質のマイナーバンドが数本検出された。「煮上げ水」では分子量約 60kDa、45kDa、38kDa、32kDa のメジャーバンド及び分子量 31kDa 未満の多数のマイナーバンドが検出された。したがって、製餡工程における 1 回目の煮熟時には小豆タンパク質は煮汁中にほとんど溶出せず、2 回目の煮熟時に多くの小豆タンパク質が煮汁中に溶出することが明らかになった。

以降の実験では、小豆煮汁として煮上げ水を用いて試験を行った。

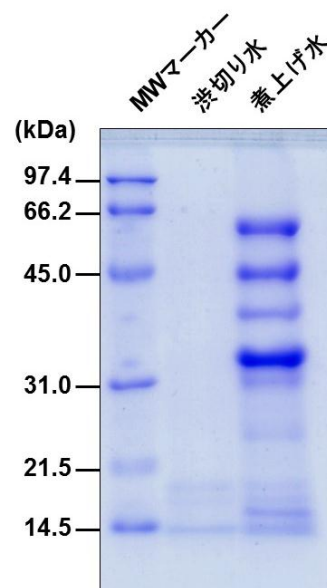


図 2 小豆煮汁の SDS-PAGE

3.2 CAP への小豆煮汁タンパク質の吸着試験

調製した 11 種類の CAP を用いて、小豆煮汁タンパク質の吸着試験を行った。

CAP 量 10% (w/v)、温度 6°C、吸着時間 16 時間の条件で小豆煮汁タンパク質を吸着させ、遠心分離によって得られた上清及び吸着前の小豆煮汁中のタンパク質量を定量することにより、吸着率を算出した (図 3)。

その結果、CAP11 が約 75% と最も高い吸着率を示し、次いで CAP6 及び CAP1 が約 60% と高い吸着率を示した。小豆煮汁タンパク質の吸着率の高い CAP は BSA 吸着量 (表 1) が高い傾向が見られた。BSA は酸性タンパク質であり、CAP のカルシウムサイトに静電的に吸着すると考えられている。したがって、小豆煮汁タンパク質の多くは酸性タンパク質であると推察された。

以降の実験では CAP として、CAP11 を使用することとした。

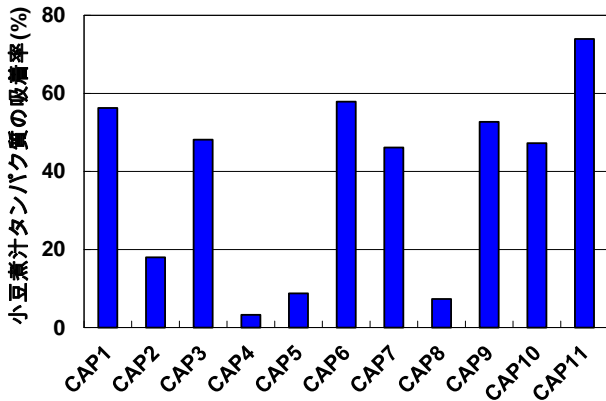


図3 調製した CAP への小豆煮汁タンパク質の吸着率

3.3 小豆煮汁タンパク質吸着に関する温度・時間の影響

CAP への小豆煮汁の吸着温度について検討したところ、CAP へのタンパク質吸着率は 6°C~80°C の範囲でほとんど差が見られなかった。また、吸着時間は約 30 分でほぼ吸着平衡になった。

3.4 小豆煮汁タンパク質の溶出・回収に関する溶離液の選択

CAP に吸着したタンパク質を溶出・回収するための溶離液の組成について検討した。吸着試験は、CAP 量 10% (w/v)、温度 40°C、吸着時間 16 時間の条件で行った。溶離液として 0.5M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) や 1M NaCl、及びこれらの組合せで、CAP 沈殿物からのタンパク質の溶出を試みたところ、0.5M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) が最も良好であり、回収率は約 85% であった。そこで以降の実験では 0.5M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) を溶離液として用いることとした。

3.5 小豆煮汁タンパク質の吸着・回収に及ぼす CAP 量の影響

小豆煮汁タンパク質の吸着及び回収に適した CAP 量を検討した。小豆煮汁を各量の CAP と 40°C、1 時間接触させた後の非吸着画分の SDS-PAGE を図 4 に、小豆煮汁と接触後の CAP からの回収液の SDS-PAGE を図 5 に示す。非吸着画分のタンパク質は、CAP 量とともに減少した。一方、回収タンパク質は CAP 量とともに増加し、CAP 量 10%以上で回収率は約 80%に達した。CAP 量の増加に伴い、タンパク質吸着率も増加するが、作業性を考慮すると、タンパク質を約 80%回収できる CAP 量 10%が妥当であると考えられた。

3.6 回収した小豆煮汁タンパク質の機能性分析

DPPH ラジカル消去能を測定した結果、回収液には若干の抗酸化活性が認められた。プロテアーゼ N やズブチリンで処理した回収液では抗酸化活性が低下しなかったが、プロテアーゼ S、トリプシン、パパイニンで処理し

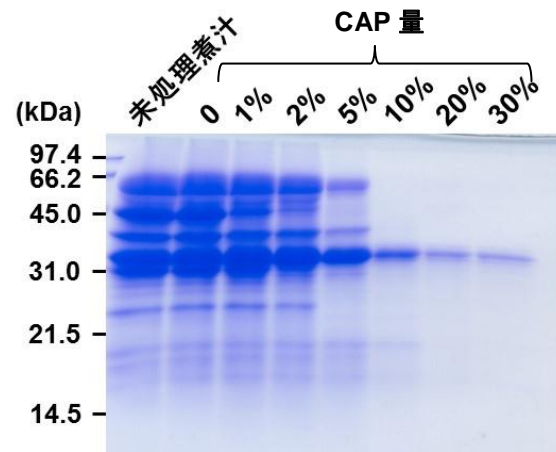


図4 CAP 接触後の非吸着画分の SDS-PAGE

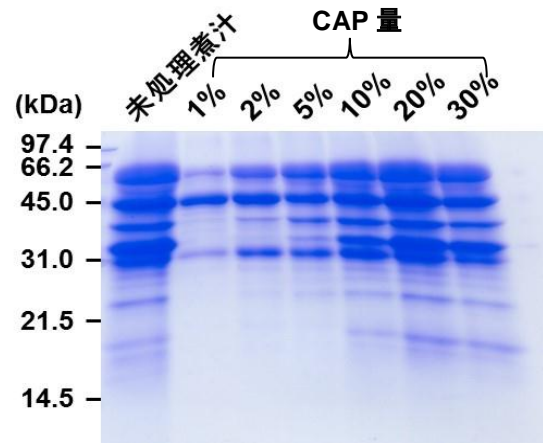


図5 タンパク質回収液の SDS-PAGE

た回収液では抗酸化活性が大きく低下した。この結果から、回収液中の抗酸化活性物質はタンパク質性の物質であると推察された。

ACE 阻害活性の測定結果を図 6 に示す。回収液の阻害活性は約 20%であったが、プロテアーゼ S 及びズブチリンを反応させると活性が約 2 倍に増大した。大豆タンパク質をプロテアーゼ処理すると ACE 阻害ペプチドが生成することが報告されている⁷⁾が、小豆煮汁においても同様に阻害ペプチドが切り出されることが示唆された。

トリプシン阻害活性の結果を図 7 に示す。回収液の阻害活性は約 95%であり、トリプシン、プロテアーゼ S、パパイニンを反応させても活性はほぼ維持された。トリプシン阻害物は小豆や大豆など豆類に存在していることは古くから知られており、以前は消化不良を引き起こすとして敬遠されていたが、最近では急性膵炎やインシュリン依存型糖尿病の治療薬としての可能性が期待されてきている⁸⁾。本研究においても、小豆煮汁にトリプシン阻害物質が存在することを確認したが、このトリプシン阻

害物質が CAP によって回収できることもわかった。また、このトリプシン阻害物質は、トリプシンのみならず、プロテアーゼ S やパパンに対しても抵抗性があった。

今後は、本研究で認められた小豆煮汁中の ACE 阻害ペプチドやトリプシン阻害物質の同定を行う予定である。

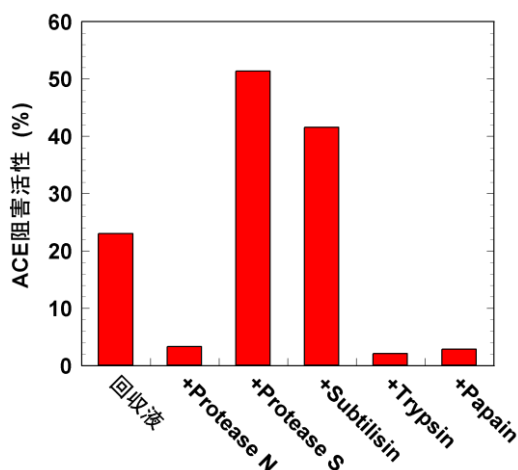


図6 回収液及びプロテアーゼ処理液の ACE 阻害活性

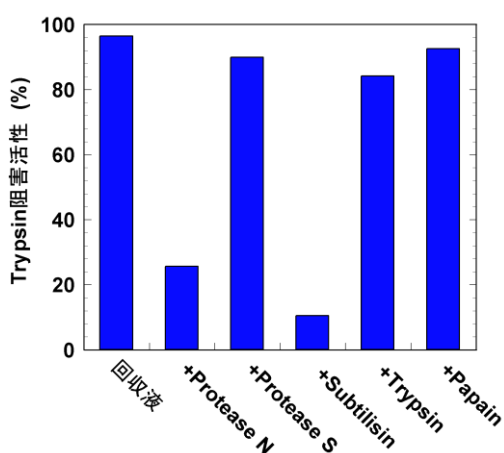


図7 回収液及びプロテアーゼ処理液のトリプシン阻害活性

4. 結び

- (1) 小豆煮汁には分子量の異なる多くのタンパク質が含まれていた。
- (2) 調製方法や Ca、P 等の配合比を変えて調製した CAP は、煮汁中のタンパク質に対する吸着特性が異なった。
- (3) CAP への煮汁タンパク質の吸着条件及び CAP からのタンパク質回収条件を最適化した結果、小豆煮汁中のタンパク質を約 80%回収することができた。
- (4) CAP からの回収物に、ACE 阻害活性やトリプシン阻害活性のあることが示唆された。

付記

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構平成 23 年度研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) フィージビリティスタディ【FS】ステージ探索タイプの研究開発にて実施した。

文献

- 1) 特開 2012-224601：小豆煮汁抽出物を含む脂質代謝改善剤
- 2) 相馬ちひろ，奥村理，加藤淳：北海道立農業試験場集報，**91**，23-29(2007-2010)
- 3) Itoh T, Hori Y, Atsumi T, Toriizuka K, Nakamura M, Maeyama T, Ando M, Tsukamasa Y, Ida Y, Furuichi Y: *Phytother Res.*, **26**(7), 1003-1011(2012)
- 4) 農林水産省農林水産技術会議事務局・食品総合研究所編：食品の機能性評価マニュアル集，16-18(1999)
- 5) 農林水産省農林水産技術会議事務局・食品総合研究所編：食品の機能性評価マニュアル集，117(1999)
- 6) M. L. Kakade, J. J. Rackis, J. E. McGhee, G. Puski: *Cereal Chem.*, **51**, 376-382(1974)
- 7) 特開 2006-265139：新規ペプチド
- 8) Y. C. Ge, R.G.H. Morgan.: *Am. J.Anatomy.*, **189**, 207-212(1990)