

研究論文

小豆製餡時に排出される渋切り水のタンパク質分解酵素阻害活性

近藤徹弥*1、日渡美世*2

Protease Inhibitory Activity in Wastewater 'Shibukiri-mizu' Produced during Adzuki Paste Manufacturing

Tetsuya KONDO*1 and Miyo HIWATASHI*2

Food Research Center*1*2

小豆を煮熟する過程で排出される渋切水にトリプシン阻害活性が存在することを見出し、阻害物質を粗精製した。本粗精製物質(渋切水 cTI)は、既報で報告した煮上水中のトリプシン阻害物質(たんぱく質)と異なり、比較的高分子のポリフェノールであることが示唆された。本物質は 121℃、15 分間の加熱処理によっても阻害活性を維持し、1~3.5%の食塩存在下における阻害活性は約 8 割に低下した。本物質はイトヨリダイのプロテアーゼを阻害し、練り製品の物性改良に有効であった。

1. はじめに

製餡工程において、小豆を茹でる工程が 2 度ある。1 回目の工程は、渋切りと呼ばれ、小豆を水から茹でて沸騰させた後、煮汁を捨てる処理であり、小豆のアクを除くために行われる。2 回目の工程は煮上げと呼ばれ、これらの工程を経ることによって、アクの抜けたあっさりとした風味の生あんになる。このように複数の煮熟工程が行われるため、排出される煮汁の量は膨大であり、大部分は利用されずに廃棄されている。製餡工程において発生する煮汁や洗浄水は、原料豆 1 トンあたり 45~50 トンにも達する。特に、煮汁廃液は多量の有機物を含むため、廃水処理施設への負荷が非常に大きい。

我々は、小豆煮汁の有効利用を目的に有効成分の探索を行う中で、トリプシン阻害物質(Trypsin inhibitor; TI)に着目した²⁾。TI は未加熱の大豆や小豆、卵白等に含まれており、たんぱく質分解酵素であるトリプシンを阻害する物質として古くから知られている。以前は消化不良を引き起こす抗栄養素とされてきたが、近年、TI による癌細胞の転移抑制やインスリンの分泌促進、急性膵炎に対する治療効果等が認められ、TI が健康機能性因子として注目されている³⁾。また、水産加工品や畜肉加工品の物性改良への利用も試みられている。しかし、長時間の煮沸を経た小豆煮汁廃液に含まれる TI の特性に関する報告はなく、小豆の TI を食品素材として活用した例も見当たらなかった。我々は前報⁴⁾において、小豆の煮上時に排出される煮汁中にたんぱく質と考えられる耐熱性の TI を見出し、その特性について報告した。本研究では、この TI とは異なる TI を渋切り時に排出さ

れる煮汁中に見出したので報告する。

2. 実験方法

2.1 小豆煮汁の調製

北海道産の普通小豆「きたろまん」1kg を 3L の精製水に浸漬し、中火にかけた。沸騰後、精製水を 0.8L 加えた。再度沸騰後、精製水を 0.8L 加え、再び沸騰させた後、小豆をザルに上げた。残った煮汁を遠心分離し、その上清を精製水で 2.5L に定容したものを渋切水とした。ザルに上げた小豆を水洗し、水切り後、再び 3L の精製水を加えて強火で沸騰させ、その後弱火で緩やかに煮た。小豆が柔らかくなった後、ザルに上げた。残った煮汁を遠心分離し、その上清を精製水で 2.5L に定容したものを煮上水とした。各煮汁のたんぱく質量、及びポリフェノール量は、それぞれ牛血清アルブミンを標準物質とした Bradford 法⁵⁾、及び没食子酸を標準物質とした Folin-Ciocalteu 法⁶⁾により測定した。

2.2 トリプシン阻害物質の精製検討のための試料調製

エタノール(EtOH)による分画では、煮上水と渋切水の凍結乾燥物を 80% EtOH に懸濁後、遠心分離を行った。上清と沈殿をエバポレーター及び凍結乾燥機を用いてエタノールを除去して 80% EtOH 上清と 80% EtOH 沈殿分画を調製した。ポリフェノール特異的吸着剤ポリビニルポリピロリドン(PVPP)による分画では、煮上水と渋切水に PVPP を 4%となるように添加し、遠心分離後の上清を PVPP 接触後の試料とした。透析の影響については、煮上水と渋切水を透析チューブ(分画分子量 3500)に入れ、精製水にて透析後、内液の凍結乾燥物を

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 食品工業技術センター 分析加工技術室

透析前と同容積になるように精製水に溶解したものを透析内液とした。

2.3 洗切水からのトリプシン阻害物質の粗精製

洗切水の凍結乾燥物を 80% EtOH に懸濁後、遠心分離を行った。上清を精製水による透析(分画分子量 3500)後、飽和食塩水にて沈殿させた。沈殿物を再度、精製水による透析にて脱塩後、凍結乾燥したものを洗切水 TI の粗精製物(洗切水 cTI)とした。

2.4 トリプシン阻害活性の測定

トリプシン阻害活性は、トリプシン(豚膵臓由来)による benzoyl-D, L-arginine-*p*-nitroanilide 加水分解反応(37°C、pH8.2)に対する阻害活性により測定した。本方法において、トリプシン 1 μ g の活性を 50%阻害(阻害率 50%)するときの阻害活性を 1 trypsin inhibition unit (TIU)と定義した(図 1 を参照)。

2.5 イトヨリダイプロテアーゼに対する阻害活性の測定

市場で購入したイトヨリダイを切り身にし、-80°C で一旦凍結したものを流水で半解凍し、ミートチョッパーにてミンチにした。ミンチ中のプロテアーゼ活性の測定には、国税庁所定分析法⁷⁾を参考にカゼイン消化法を用いた。すなわち、ミンチに 2 倍量の 0.2M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)を加えてホモジナイズし、遠心分離後の上清をプロテアーゼ抽出液とした。たんぱく質として 1mg を含むように希釈した抽出液に精製水(対照)、あるいは cTI(乾燥物として 0.27mg)を加え、60°C で 20 分間の予備保温後、カゼイン(反応時の終濃度 1%)を添加して 60°C で 1 時間反応させた。0.4M トリクロロ酢酸(TCA)を添加して反応を停止した後、遠心分離を行い、上清の TCA 可溶性ペプチドを folin 呈色法によりチロシン相当量として求め、プロテアーゼ活性を算出した。cTI 添加に伴うプロテアーゼ活性の低下から阻害活性を求めた。

2.6 イトヨリダイすり身の自己消化の測定

イトヨリダイ冷凍すり身(パキスタン産、砂糖約 6%、リン酸塩約 0.23%含有)に 15%量の精製水(対照)、または洗切水 cTI 水溶液(27mg/mL)を加え、さらに 3%量の食塩を加えてホモジナイズし、60°C で 2 時間反応させた。2.5 と同様に TCA にて反応停止後、TCA 可溶性ペプチドをチロシン相当量として求め、cTI 添加による TCA 可溶性ペプチドの残量から阻害活性を求めた。

2.7 魚肉ゲルの調製と物性測定

イトヨリダイ冷凍すり身に精製水(対照)、または洗切水 cTI 水溶液(20mg/mL)を 10%量添加し、氷冷下、乳鉢内でよく混合した。続いて、すり身に対して 2.5%量の食塩を添加してよく摺り混ぜた。これをケーシングチューブ(ϕ 25mm、PVDF 製)に充填し、一次加熱を 40°C も

しくは 60°C で 30 分間、続いて二次加熱を 90°C で 20 分間行った。一次加熱を 40°C で行ったものを坐りゲル、60°C で行ったものを戻りゲルとした。

各ゲルは 2cm 幅で円柱状に切断した。ゲルの物性測定には既報⁴⁾の方法を用い、破断強度と圧縮距離(凹み)を測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 小豆煮汁の成分とトリプシン阻害活性

得られた煮汁 100mL 当たりの乾燥重量は、洗切水で 2.08g、煮上水で 1.51g であった。たんぱく質(煮汁 100g あたり)及びポリフェノール量(煮汁 100mL あたり)は、洗切水で 0.2g と 157.9mg、煮上水で 0.3g と 22.2mg であった。このように、煮上水に比べて洗切水では、たんぱく質がやや少なく、ポリフェノールが非常に多かった。

洗切水と煮上水のトリプシン阻害率を図 1 に示す。試薬標品の卵白トリプシンインヒビター(卵白 TI)程ではないが、洗切水と煮上水のどちらにも用量依存的に TI 活性のあることが認められた。

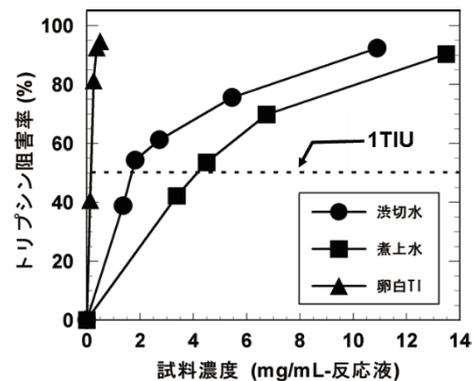


図 1 小豆煮汁乾燥物のトリプシン阻害活性

3.2 小豆煮汁のトリプシン阻害物質の粗精製

洗切水から TI を精製するための予備検討を行った。EtOH、PVPP、透析が各煮汁のトリプシン阻害活性に及ぼす影響を図 2 及び図 3 に示す。既に報告した⁴⁾ように、煮上水の TI は 80% EtOH に不溶であり、ポリフェノール特異的吸着剤である PVPP にはあまり吸着されず、分画分子量 3500 の透析膜を用いた透析においても活性の低下は認められなかった。これに対し、洗切水の TI は、未処理では 1.5 TIU であったのに対し、80% EtOH 上清画分では約 1.2 TIU、沈殿画分では約 0.6 TIU となり、可溶性と不溶性の両画分に分かれた。比活性(乾燥重量あたりのトリプシン阻害活性)は、80% EtOH 沈殿画分では処理前とほぼ同等であったのに対し、80% EtOH 上清画分では約 3 倍に上昇した。また、煮上水と同様に洗切水においても、透析による活性の低下はほとんど見られなかった。PVPP 処理では、煮上水のトリブ

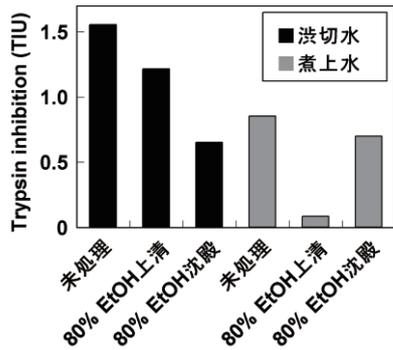


図2 80% エタノールの小豆煮汁 TI 活性への影響

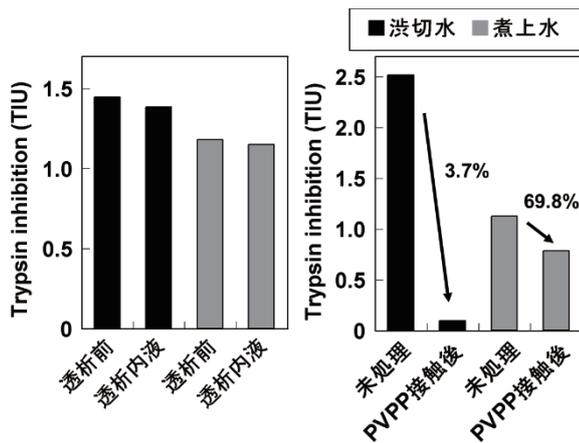


図3 透析(左)やPVPP(右)の小豆煮汁 TI 活性への影響

シン阻害活性は約 30%減に留まったのに対し、渋切水では 3.7%にまで低下した。

これらの情報を基に、2.3 で示した方法に従い、渋切水から TI を部分精製した。最終的に、渋切水 2L の乾燥物 46.1g(26.1TIU/mg) から、1.1g(201.5TIU/mg) の cTI を得ることができた。比活性は約 7.7 倍に上昇した。渋切水 cTI は、PVPP に吸着されること、80% EtOH に可溶であるが飽和食塩水で沈殿すること、さらに赤外分光スペクトルや SDS-PAGE の結果(共に図示せず)から、煮上水 cTI のようなたんぱく質ではなく、分子量 3500 以上のポリフェノールであることが示唆された。

3.3 渋切水 cTI の特性

魚肉練り製品は、魚肉のすり身に 2~3%の食塩を添加して塩摺り後、加熱してゲル化させる。そこで、食塩や加熱が cTI の活性に及ぼす影響について検討した。

渋切水 cTI を各温度で 30 分加熱(オートクレーブでは 121°C で 15 分)後、冷却して、残存トリプシン阻害活性を測定した(図 4)。煮上水 cTI では、処理温度の上昇と共にトリプシン阻害率がやや低下した⁴⁾のに対し、渋切水 cTI では温度とともに活性が増大したことから、渋切水 cTI の方が煮上水 cTI よりも耐熱性が高いことがわかった。

図 5 に、煮上水 cTI のトリプシン阻害率に対する食塩

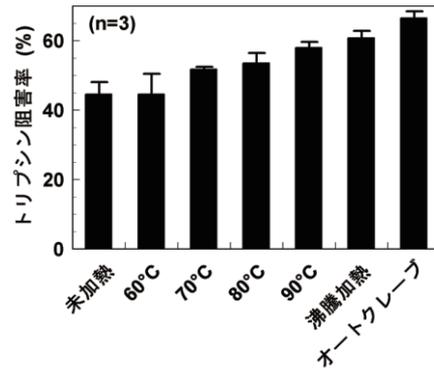


図4 渋切水 cTI の熱安定性

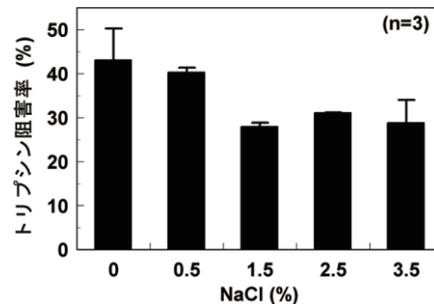


図5 渋切水 cTI のトリプシン阻害活性に及ぼす食塩濃度の影響

濃度依存性を示す。煮上水 cTI⁴⁾と同様に、食塩濃度(トリプシン阻害活性測定時)が 1.5~3.5%の範囲では阻害活性は約 8 割に低下した。

3.4 渋切水 cTI によるイトヨリダイ練り製品の物性改良効果

魚肉練り製品では、塩摺りしたすり身を放置(坐り)後に 90°C 前後で加熱することによって、ぷりぷりとした独特の弾力が得られる。この独特の弾力は、製品の品質を左右する最も重要な要素である。弾力の良し悪しは、坐り時の環境温度や時間、加熱までの温度履歴に大きく依存する。塩摺りしたすり身を 40°C 以下の低温で一定時間放置すると弾力が増すが、長時間の坐りや 50~60°C 付近での緩慢な加熱は、弾力を著しく低下(戻り)させて品質を落とす原因となる。この戻りの原因の一つが、魚肉中に存在するプロテアーゼであるといわれている。魚肉には様々なプロテアーゼが存在している。魚肉練り製品の原材料としてよく使用されるイトヨリダイは、トリプシンと同じく活性中心にセリンを有するセリンプロテアーゼを有している。これまでに、50°C で活性化されるセリンプロテアーゼと 60°C で活性化されるセリンプロテアーゼが戻り現象に関与することが報告されている^{8),9)}。渋切水 cTI が魚肉中の戻り現象に関わるプロテアーゼの活性を阻害できれば、練り製品の品質を高めることが期待される。既に、大豆や乾燥卵白、牛血漿成分由来の TI は魚肉中のセリンプロテアーゼ活性を阻害することが明らかにされており、魚肉練り製品の物性改善

(弾力の低下抑制や増強)にも利用されている。

イトヨリダイのプロテアーゼに対する阻害活性を測定した結果、渋切水 cTI はカゼインを基質とした場合にイトヨリダイのプロテアーゼを 62%阻害した(結果は図示せず)。

次に、渋切水 cTI がイトヨリダイのすり身のたんぱく質の分解(自己消化)を阻害するかどうかについて検討した。SDS-PAGE 解析の結果からは、cTI 添加の有無によるバンドパターンの明確な差は認められなかったが、すり身中の遊離ペプチドの量は cTI 添加により減少し、イトヨリダイすり身の自己消化を渋切水 cTI では約 80%阻害することがわかった(結果は図示せず)。

このように、煮上水 cTI⁴⁾と同様に、渋切水 cTI がイトヨリダイのプロテアーゼを阻害し、自己消化を抑制できることが示されたので、戻りゲル及び坐りゲルを調製して、物性解析を行った。結果を図 6 に示す。対照(精製水)に対して cTI 添加区では坐りゲル、戻りゲルともに破断強度が有意(図 6 中 *: $p < 0.05$ で有意差有)に増加した(図 6 左)。圧縮距離は、坐りゲルでは有意差は認められなかったが、戻りゲルでは cTI 添加によって有意に増加した(図 6 右)。また、対照のゲルが白色であるのに対し、渋切水 cTI 添加区は薄い赤茶色を呈した。試食の結果、cTI 添加区の坐りゲル、戻りゲルは対照区に比べて弾力があり、プリプリとした食感を有していた。渋切水 cTI はポリフェノールが多く含まれているため渋味

などが懸念されたが、対照区と比較して風味の差は認められなかった。

4. 結び

本研究の結果は、以下のとおりである。

- (1) 小豆煮熟過程で排出される渋切水からトリプシン阻害物質を部分精製した。
- (2) 本粗精製物質はポリフェノールであることが示唆された。
- (3) 本物質は、121℃、15 分間の加熱や 1~3.5%食塩存在下においても阻害活性を維持した。
- (4) 本物質は、イトヨリダイのプロテアーゼを阻害し、練り製品の物性を向上させた。

付記

本研究の一部は、公益財団法人日本豆類協会平成 26 年度豆類振興事業助成金を受けて実施した。

文献

- 1) 鈴木繁男監修: 鮎ハンドブック, 285(1975), 光琳書院
- 2) 石原那美, 永井あゆみ, 近藤徹弥: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **3**, 76(2014)
- 3) H. Kobayashi: *Front. Bioci. (Elite Ed)*, 966(2013)
- 4) 近藤徹弥, 日渡美世, 石原那美, 山本晃司: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **4**, 120(2015)
- 5) M. M. Bradford: *Anal. Biochem.*, **72**, 248(1976)
- 6) 日本食品科学工学会, 食品分析研究会(編): 新・食品分析法[II], 68(2006), 光琳書院
- 7) 第四回改正国税庁所定分析法注解, 223(2003)
- 8) M. Kinoshita, H. Toyohara, Y. Shimizu, M. Sakaguchi: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1935(1991)
- 9) M. Kinoshita, H. Toyohara, Y. Shimizu, M. Sakaguchi: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 715(1992)

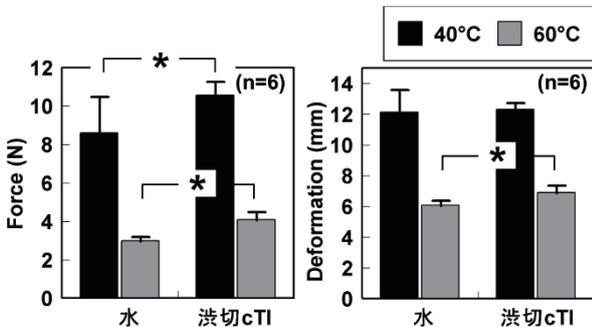


図 6 イトヨリダイ魚肉ゲルの破断強度(左)、及び圧縮距離(右)