枝豆のトリプシンインヒビターについて— 特に栽培中の消長†

谷村和八郎*・鴨居郁三**・小原哲二郎**

Distribution of Trypsin Inhibitors in Green Soybean (Edamame) during Cultivation†

WAHACHIRO TANIMURA*, IKUZO KAMOI** and TETSUJIRO OBARA**

Green soybean is widely consumed as "Edamame" (boiled green soybean) in Japan because of its characteristic taste and nutritional value. It is well known that mature soybean contains several kinds of trypsin inhibitors (TI), but a few paper were available about TI in green soybean. In order to know the changes of TI activities in green soybean during maturation, soybeans were harvested periodically from the plants cultivated for 111 days to 165 days. The results are as follows; (1) TI activity was not observed within 116 days of cultivation. TI activity was found in the soybeans harvested from 123 day-old plants. TI activity in the soybeans was measured during cultivation from 123 to 165 days periodically. The maximum TI activity was determined to be 17.9 mg/g of fresh weight and specific activity was 168 in green soybean picked from 137 day-old plants seed length, 1.2-1.4 cm. TI activity in green soybean increased with the growth of seeds; TI activity of green soybean of seed length 0.8-1.0 cm was only 6.9 mg/g of fresh weight, whereas, that of seeds of 1.0-1.2 cm length was 14.7 mg/g of fresh weight. (2) TI in soybean was fractionated by chromatography on columns of Sephadex G-75 and DEAE-cellulose. (i) TI in green soybean of seed length 1.2-1.4 cm was separated into 4-6 TI peaks on Sephadex G-75 and main inhibitors were No. 3 and No. 4 peaks. TI activity ratio of No. 3 and No. 4 to total TI activity increased with cultivation period. TI in green soybean of short length (less than 1.2 cm) was fractionated into six peaks and main inhibitors were also No. 3 and No. 4 peaks. (ii) TI of No. 3 and No. 4 peaks obtained by gel-filtration were further fractionated with a DEAE-cellulose column. The number of TI peaks in same length seeds tended to decrease with cultivation days. TI in the seeds of same size (1.2-1.4 cm length) picked from 123, 159 and 165 day-old plants had 7, 5 and 4 peaks by column chromatography on DEAE-cellulose, respectively. (3) Changes of TI activity in green soybean by heating were also investigated. TI activity in green soybean obtained from local market was 19.7 mg/g of fresh weight and decreased slightly to 13 mg/g of fresh weight by the heat treatment at 100°C for 5 min. TI in this heat-treated green soybean was fractionated into 9 peaks on Sephadex G-75.

(Received Sept. 12, 1979)

枝豆は大豆の葉が黄変し、種子が完熟する以前のものを莢ごと収穫し、これを莢ごと熱湯中で煮沸したもので加熱以外の加工操作は加えられていない。その風味は完

熟大豆に比べて肉質は軟かく緑色を呈し、独得の香味は広く好まれている。著者らは大豆加工食品のトリプシンインヒビター（以下 TI と略す）を調べる目的でゆばり

† 大豆加工食品のトリプシンインヒビターに関する研究（第3報）（前報，文献2）
Study on Trypsin Inhibitor in Soybean Foods (Part III)

* 東京農業大学栄養学科（〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1）
Dept. of Nutrition, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo, 156

** 東京農業大学農芸化学科（〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1）
Dept. of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo, 156

およびもし²⁾の TI について報告したが、本報告では枝豆を検討した。

大豆に TI があることは既に知られているところであるが、発芽豆の TI については H. CHATTOPADHYAY³⁾, K.S. AMBE^{4,5)}, F.X. FILHO⁶⁾ らの報告があり。著者らも前報に報告した。しかし枝豆の TI について報告はみられないので、著者らは大豆を播種栽培し、結実後枝豆として食用に供することが可能である期間中の枝豆を採取し、豆粒中の TI を調べたのでその結果を報告する。

実験方法

1. 供試試料

枝豆は埼玉県の農家で栽培されているものを用いた。すなわち大豆の播種は5月10日に行われ、7月下旬に開花し、種子が形成され始めてから枝豆を収穫した。収穫は8月30日の栽培後110日より行い、116日, 123日(A), 130日(B), 137日(C), 144日(D), 152日(E), 159日(F)および165日(G)の10月23日まで、この間7日毎に9回収穫を行った。また収穫した枝豆は豆粒の大きさにより長径が0.8~1.0 cm, 1.0~1.2 cm および 1.2~1.4 cm のそれぞれに分けて調べた。

2. 水溶性蛋白質の抽出

水溶性蛋白質の抽出方法は第1報⁷⁾の方法により行った。即ち磨砕した枝豆5gに10倍量のリン酸緩衝液(0.1M, pH 7.6)を加えて30分間攪拌したのち遠心分離(3,000 rpm, 10分)を行ない沈澱は更に繰返して同様に処理したのち上澄液を合せて100 ml とし、枝豆の水溶性蛋白質液とし TI の測定に用いた。

3. TI の測定法

TI 活性の測定は KUNITZ⁸⁾ のカゼイン消化法により行った。即ち試料 0.5 ml を試験管にとり、これにトリプシン溶液 (Miles 社 50 μ g TI/ml) 0.5 ml および 0.1 % カゼイン溶液 (Merk 社) 1.0 ml を加え、35°C で20分間反応させたのち5% TCA 溶液 3 ml を加えて反応を停止させた。室温で1時間放置した後逕過して逕液(S), の 280 nm 吸収を測定した。なおトリプシン溶液と TCA 溶液の添加を逆転したブランク (S_B) 並に試料の代りに緩衝液を用いたコントロール (C) およびコントロールブランク (C_B) についても同様に 280 nm 吸収を測定した。TI 活性の算出は次式により行った。

$$\text{TI 活性 } (\mu\text{g}) = \frac{(C - C_B) - (S - S_B)}{(C - C_B)} \times \text{トリプシン } (\mu\text{g/ml})$$

3. Sephadex G-75 によるゲル逕過

枝豆より調整した水溶性蛋白質溶液 (蛋白質として約 100 mg 含有) をゲル逕過に用いた。Sephadex G-75 のカラム (30×900 mm) に各試料を流下し吸着させたのち、流速 22.5 ml/hr., 温度 4~6°C で溶出を行い、各 5 ml 宛を分取して 280 nm の吸光度および TI 活性を測定した。また 280 nm の吸光度 1.0 OD を 1 mg の蛋白質として表した。

4. DEAE-セルロースによるクロマトグラフィー

Sephadex G-75 で分画した TI 活性画分を集め、低温で透折後ポリエチレングリコール 1,000 を用いて濃縮したものを DEAE-セルロースクロマトグラフィーの検体とした。

DEAE-セルロースはカラム (20×330 mm) に充填したのち、リン酸緩衝液 (pH 7.8, 0.01M) を流し平衡化した。溶出には食塩濃度 0~0.5M の gradient elution で行った。

流速は 28 ml/hr. 溶出は 5 ml 宛分取し、280 nm の吸光度と TI 活性を測定した。

結果および考察

1. 栽培日数と TI 活性の変化

大豆は5月10日に播種され、栽培日数 111 日と 116 日の枝豆では豆粒の粒長は 0.8 cm 以下であって未熟であり、TI 活性を測定したがこれらの豆粒には TI が全く生成されていなかった。栽培日数 123 日以降の枝豆につ

Fig. 1. Change of trypsin inhibitor in green soybean (wet) picked from different stages of cultivation

■ seed length 0.8-1.0 cm
 ▨ seed length 1.0-1.2 cm
 □ seed length 1.2-1.4 cm

Table 1. Changes of water content, crude protein, total trypsin inhibitor activity and specific activity during soybean cultivation (seed length 1.2-1.4 cm)

No.	Cultivate term (days)	Water content (%)	Crude protein (%)	Total trypsin inhibitor activity (mg/g of fresh weight)	Specific activity* ³
A	123	82.55	8.40 (48.14)* ¹	9.74 (55.82)* ²	116
B	130	76.45	9.51 (40.34)	15.74 (66.84)	165
C	137	72.07	10.69 (38.27)	17.92 (64.16)	168
D	144	69.43	11.80 (38.60)	17.49 (57.21)	148
E	152	65.56	13.35 (38.76)	14.70 (51.39)	133
F	159	47.06	15.01 (28.35)	18.47 (34.88)	123
G	165	15.13	32.30 (38.06)	38.18 (44.98)	118

*¹ number of parenthesis is per cent for dry matter.*² number of parenthesis is mg/g of dry weight.*³ total trypsin inhibitor activity ($\times 10^3$ ug/g)/crude protein (g).

いて粒長別に TI を測定し Fig. 1 に示した。

(1) 粒長 0.8~1.0 cm および 1.0~1.2 cm の豆粒について

栽培日数が同期間のものでは豆粒が大きくなるに従い TI 活性が増加している。すなわち生豆粒 1 g の TI をみると、粒長 0.8~1.0 cm では栽培日数 123 日の TI は 2.01 mg, 130 日は 6.91 mg, 137 日は 5.0 mg, 粒長 1.2~1.4 cm の TI は 123 日 9.74 mg, 130 日 15.74 mg, 137 日 17.92 mg であり、粒長 0.8~1.0 cm の豆粒と比べると TI は約 2~3 倍になっている。粒長 1.0~1.2 cm の豆粒の TI は粒長 1.2~1.4 cm の成熟豆と比べ栽培日数 123 日は 68.7%, 130 日では 90%, 137 日では 81.9% と TI は少ないが、栽培日数が長くなると TI が増加し、その差は少なくなってくる。栽培日数 144 日以降は豆粒の粒長は 1.2~1.4 cm と大きさが一定となり、未熟豆がみられなくなった。

(2) 粒長 1.2~1.4 cm の豆粒について

栽培日数 123 日以後になると枝豆の豆粒は成熟しはじめ、粒長は 1.2~1.4 cm になる。この成熟枝豆の豆粒を栽培日数によって TI を調べ Table 1 に示した。

生豆粒 1 g の TI 活性は栽培日数 123 日から 130 日では 9.74 mg から 15.74 mg と急激に増加し、その増加率は約 1.6 倍になっている。137 日は 17.92 mg となり、それ以後 159 日までの TI は 18.0 mg 前後を示している。栽培日数 165 日になると TI は 38.18 mg とそれまでの約 2 倍に増加している。これは栽培日数 159 日 (10 月 17 日) 頃より大豆の莖葉が枯れ始め、水分が減少するため相対的に TI が増加したことによる。

このため枝豆の豆粒を無水物 1 g で比較し TI 活性をみると栽培日数 130 日に急増して 66.64 mg となるがそれ以後は徐々に減少して 165 日では 44.98 mg となり、

見掛けの値とは大きな相異を示している。また比活性をみると栽培日数 123 日が 116, 137 日が 168 と最も高くなったが、144 日は 148, 159 日は 123, 165 日は 118 と減少し、初期と同程度まで比活性が下った。このように TI 活性が完熟期に最高になるのではなく、完熟期の約 1 ヶ月前に最高となっている。これは種族保護と関係があるように思えるが枝豆としては TI の多い時期に利用されているようである。

2. Sephadex G-75 によるゲル濾過

栽培日数 123 日, 130 日の粒長 0.8~1.0 cm, 130 日の粒長 1.0~1.2 cm および 123 日, 159 日, 165 日の粒長 1.2~1.4 cm の各枝豆の豆粒について、その水溶性蛋白質のゲル濾過を行い TI 活性をみた。その 280 nm 吸収で最初の大きなピークは大豆蛋白質、後半に核酸類化合物のピークが見られ、TI ピークはその中間にみられた。

(1) 粒長 0.8~1.0 cm と 1.0~1.2 cm の豆粒について

Sephadex G-75 によるゲル濾過の結果を Fig. 2, その相対活性量を半値法により算出し Table 2 に示した。

粒長 0.8~1.0 cm において、栽培日数 123 日では 6 種の TI ピークがみられ、ピークは 1, 3, 4, 7, 8, 9 であった。その主要ピークは No. 3 と No. 4 でその相対活性量は 51.1% と 36.6% で合計約 88% に達している。栽培日数 130 日のものは 6 種の TI ピークがみられ、ピークは 1, 2, 3, 4, 5, 7 である。主要ピークは No. 3 と No. 4 で相対活性量は 40.7% と 31.1% で合計 71.8% であった。他の豆粒に比べピーク No. 1, No. 2, No. 3, No. 5 の TI 活性量が大きかった。

粒長 1.0~1.2 cm の栽培日数 130 日のものは 6 種の TI ピークが得られ、1, 3, 4, 6, 8, 10 であった。主要ビ

Fig. 2. Gel-filtration of trypsin inhibitor of water soluble protein in green soybeans on Sephadex G-75

— trypsin inhibitor
..... O.D. 280 nm

- A. Picked from 123 day old plants, seed length 8.8-1.0 cm
B. Picked from 130 day old plants,
1. seed length 0.8-1.0 cm
2. seed length 1.0-1.2 cm

Table 2. Comparison of trypsin inhibitor patterns on Sephadex gel-filtration

Peak	Seed length		
	0.8-1.0 cm	1.0-1.2 cm	
	A mg (%)	B-1 mg (%)	B-2 mg (%)
1	0.086 (4.3)	0.547 (7.9)	0.241 (1.7)
2	—	0.644 (9.3)	—
3	1.028 (51.1)	2.816 (40.7)	7.624 (53.8)
4	0.737 (36.7)	2.152 (31.1)	6.207 (43.8)
5	—	0.429 (6.2)	—
6	—	—	—
7	0.011 (0.5)	0.332 (4.8)	—
8	0.043 (2.1)	—	—
9	0.106 (5.3)	—	—
10	—	—	0.099 (0.7)
Total	2.011 (100)	6.920 (100)	14.171 (100)

ークは No. 3 と No. 4 で相対活性量は 53.8% と 43.8% で合計 77.6% であり, TI 活性のほとんどが No. 3, No. 4 であった。

粒長ならびに栽培日数による TI パターンはいずれも 6 種の TI がみられたが, 共通のものは粒長 0.8~1.0 cm では No. 1, 3, 4, 7 の 4 種で, その他は 123 日が 8, 9, 130 日が 2, 5 とパターンが異なった。粒長 1.0~1.2 cm では 130 日のみであるが, 上記と共通のピークは No. 1, 3, 4 であり, ピーク 7 は消失している。また新しく No. 6, 8, 10 のピークがあり TI 分子が小さくなっているようである。それ等の主要ピークは No. 3 と No. 4 で相対活性量よりみると TI の大半を占めており, 粒長の小さい豆粒は No. 3 と No. 4 が全 TI に対し 71~88% を占め, 粒長が大きくなると 96% とそのほとんどを占めていた。

Fig. 3. Gel filtration of trypsin inhibitor of water soluble protein in green soybeans (seed length 1.2-1.4 cm) on Sephadex G-75

— trypsin innibitor
..... O.D. 280 nm

- A. Picked from 123 day old plants
F. Picked from 159 day old plants
G. Picked from 165 day old plants

Table 3. Comparison of trypsin inhibitor patterns on Sephadex gel-filtration (Seed length 1.2-1.4 cm)

Peak	A mg (%)	F mg (%)	G mg (%)
1	—	—	—
2	0.409 (4.2)	—	1.279 (3.4)
3	4.676 (48.0)	9.104 (49.3)	16.924 (44.3)
4	4.277 (43.9)	8.183 (44.3)	18.749 (49.1)
5	—	0.509 (2.7)	—
6	—	—	0.668 (1.8)
7	—	0.680 (3.7)	0.279 (0.7)
8	0.380 (3.9)	—	—
9	—	—	0.279 (0.7)
10	—	—	—
Total	9.742 (100)	18.476 (100)	38.178 (100)

(2) 粒長 1.2~1.4 cm の豆粒について

Sephadex G-75 によるゲル濾過については Fig. 3, その相対活性量を Table 3 に示した。

栽培日数 123 日では 4 種の TI がみられ、ピークは No. 2, 3, 4, 8 であった。主要ピークは No. 3 と No. 4 で相対活性量は 48.0% と 43.9% で合計 91.9% であった。159 日は 4 種の TI がみられ、ピークは No. 3, 4, 5, 7 である。主要ピークは No. 3 と No. 4 で相対活性量は 49.3% と 44.3% で合計 93.6% である。165 日では 6 種の TI ピークがみられ、No. 2, 3, 4, 6, 7, 9 であった。主要ピークは No. 3 と No. 4 で相対活性量は 44.3% と 49.1% であり合計 93.4% であった。

粒長 1.2~1.4 cm での共通ピークは No. 3 と No. 4 で、このピークは主要ピークでもあり栽培日数の増加と共に両ピークの占める割合が大きくなる。これらの TI ピークは第 1 報⁷⁾ の大豆水溶性蛋白質のゲル濾過を行った際の A, B のピークに相当し、大豆のゲル濾過ではこの 2 ピークのみしが認められなかったが、栽培日数により経時的に枝豆の豆粒を調べた本実験では TI ピークのピーク数が多数出現し、TI 分子の未会合のものがみられるようである。

3. DEAE-セルロースによるクロマトグラフィー

栽培日数 130 日の粒長 0.8~1.0 cm と粒長 1.0~1.2 cm の 2 種、および粒長 1.2~1.4 cm の栽培日数 123 日, 159 日, 165 日の 3 種, 合計 5 種の豆粒について Sephadex G-75 のゲル濾過で得られた TI 活性画分のうち、主要ピークである No. 3 と No. 4 のフラクションを集めて濃縮し、DEAE-セルロースによりクロマトグラフィーを行った。これ等の結果を Fig. 4, Fig. 5 ならびに相対活性量を Table 4 に示した。

栽培日数 130 日の粒長 0.8~1.0 cm と 1.0~1.2 cm の豆粒は 7 種の TI ピークが得られ、このうち No. 1, 2, 4, 6, 8, 9 のピークは共通であったが、粒長 0.8~1.0 cm の No. 11, 粒長 1.0~1.2 cm の No. 10 は異なっていた。主要ピークをみると粒長 0.8~1.0 cm は No. 6 と No. 11 で相対活性量は 34.3% と 32.7% であり、粒長 1.0~1.2 cm では No. 4 と No. 10 で相対活性量は 28.4% と 27.2% であった。共通ピークでない No. 11 と No. 10 がそれぞれの主要ピークの一つになっていた。

粒長 1.2~1.4 cm の TI パターンをみると栽培日数 123 日では 7 種の TI ピークがみられ、ピーク No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 であった。159 日は 5 種の TI ピークがみられ、ピーク No. 2, 3, 5, 7 であった。栽培日数が短い時は TI ピーク数が多いが、日数が長くなるに従い TI ピーク数が少なくなる。主要ピークは 123 日が No. 4 と No. 6 で相対活性量は 60.7% と 18.9%, 159 日は No. 5 と No. 7 で相対活性量は 61.7% と 28.8%, 165 日は No. 2 と No. 3 と No. 5 で相対活性量は 32.5%, 32.4%, 31.5% であった。栽培日数が短い時は主要ピークの TI 活性中に占める割合は高いが日数が長くなると主要ピークが多くなり TI 中に占める

Fig. 4. Chromatogram of trypsin inhibitor of gel filtration in green soybean (130 day cultivation) on DEAE-cellulose column

— trypsin inhibitor
 O.D. 280 nm
 --- NaCl (M)

Fig. 5. Chromatogram of trypsin inhibitor of gel filtration in green soybean (seed length 1.2-1.4 cm) on DEAE-cellulose column

— trypsin inhibitor
 O.D. 280 nm
 --- NaCl (M)

A. Picked from 123 day old plants
 F. Picked from 158 day old plants
 G. Picked from 165 day old plants

Table 4. Comparison of trypsin inhibitor of gel-filtration in green soybeans on DEAE-cellulose

Peak	Seed length				
	0.8-1.0 cm	1.0-1.2 cm	1.2-1.4 cm		
	B-1 (%)	B-2 (%)	A (%)	F (%)	G (%)
1	11.0	5.4	0.7	—	—
2	1.4	16.7	3.1	—	32.5
3	—	—	6.7	3.2	32.4
4	11.0	28.4	60.7	1.2	—
5	—	—	1.1	61.7	31.5
6	34.3	6.8	18.9	—	—
7	—	—	—	28.8	3.6
8	5.5	9.2	8.8	5.1	—
9	4.1	6.3	—	—	—
10	—	27.2	—	—	—
11	32.7	—	—	—	—

割合は分散されていくようである。

TI ピークの変化は栽培日数が短かく、または粒長が小さい時は TI ピーク数が多くなるが、日数が長く、粒長が大きくなるに従って TI ピークの数は少なくなる。また主要ピークの相対活性量は No. 4 から No. 5 に移り、最後に均等に分散されていくようである。

4. 加熱による TI の変化

枝豆として使われる豆粒には TI が多く含まれることが分ったので、市販枝豆を用い、100°C で5分間煮沸して可食状態とし、この時の TI を調べた。

生枝豆 1g 中の TI は 19.7mg であるのに対し加熱後の枝豆 1g には 13mg の TI があり、加熱により TI は約 66% に減少している。しかしまだかなりの TI が加熱枝豆に残存していた。加熱後の TI を Sephadex G-75 でゲル濾過を行ったものを Fig. 6 に示した。加熱により枝豆中の TI は最初2種のピークであったものが9種のピークに解離しているのがみられた。

Fig. 6. Change of trypsin inhibitor of water soluble protein in green soybean after boiling on Sephadex G-75

要 約

枝豆の TI を調べる目的で大豆を播種後栽培 111 日より 165 日まで毎週経時的に TI 活性を測定した。

(1) 枝豆中の TI は栽培日数 116 日まででは認められ

ず、123日の豆粒より TI がみられた。枝豆として利用出来る粒長 1.2~1.4 cm の成熟豆は 130 日より収穫できた。TI 量は 127 日のものが最高で生豆粒 1 g 中に 17.92 mg であった。この時の比活性は 168 である。

枝豆の粒長により含まれる TI 量は異なり、生豆粒 1 g 中の TI は粒長 0.8-1.0 cm では 6.91 mg が最高であった。粒長 1.0-1.2 cm は 14.7 mg で成熟豆に近い値である。

(2) Sephadex G-75 による TI のゲル濾過では粒長 1.2-1.4 cm の豆粒では 4~6 種の TI ピークがみられ、主要ピークは No. 3, No. 4 であった。栽培日数の増加と共に No. 3, No. 4 のピークが占める割合が大きくなる。粒長の短いものは 6 種の TI ピークがみられた。その主要ピークは No. 3, No. 4 であった。

(3) Sephadex G-75 でゲル濾過した No. 3, No. 4 の TI ピークについて DEAE セルロースによるクロマトグラフィーを行った。粒長 1.2~1.4 cm では 123 日が 7 種、159 日が 5 種、165 日が 4 種と栽培日数が長くなるに従いピーク数が減少する。また粒長が大きくなるに従い TI ピーク数が減少した。

(4) 枝豆の加熱による TI の変化は市販枝豆の生豆 1 g 中の TI 量は 19.7 mg であった。100°C, 5 分間煮

沸の枝豆は 1 g 中に 13 mg であった。この時の TI を Sephadex G-75 でゲル濾過を行ったところ、生豆のピークは 2 種であったが、加熱により 9 種のピークがみられた。

終りに臨み御協力をいただいた鈴木康信氏、遠藤聡子氏に深謝致します。

文 献

- 1) 谷村和八郎・鴨居郁三・小原哲二郎：日食工誌, 25, 287 (1978).
- 2) 谷村和八郎・鴨居郁三・小原哲二郎：日食工誌, 27, (1980).
- 3) CHATTOPADHYAY, H. and BANERJEE, S.: *Ind. Jour. Med. Res.*, 41, 185 (1953).
- 4) AMBE, K.S. and SOHENIE, K.: *Experientia*, 12, 302 (1956).
- 5) AMBE, K.S. and SOHENIE, K.: *J. Sci. Industr. Re.*, 15, 136 (1956).
- 6) Jose Xavier Filho: *Physiol Plant*, 28, 149 (1973).
- 7) 中村博治・鴨居郁三・谷村和八郎・小原哲二郎：日食工誌, 22, 415 (1975).
- 8) KUNITZ, M.: *J. Gen. Physiol*, 30, 291 (1947).
(昭和 54 年 9 月 12 日受理)