血漿蛋白質のもつプロテアーゼ阻害活性の食品素材への利用

斎藤昌義*・門間美千子*・千國幸一*

Utilization of Plasma Proteins as Protease Inhibitor in Food Processing

Masayoshi Saito*, Michiko Monma* and Koichi Chikuni*

* National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305

Protease inhibitory activities of plasma proteins from slaughtered pig were investigated with a view to preventing damage on food by proteases during food processing or storage. Plasma proteins inhibited trypsin, α -chymotrypsin and elastase, but their inhibitory activities were lower than those of egg white proteins. It was possible to obtain a fraction having high inhibitory activity from plasma proteins by ion-exchange chromatography. Inhibitory activity of plasma proteins was stable in alkaline conditions, but unstable in acidic conditions. After heat treatment of plasma protein solutions at 80°C for 30 min at pHs 3, 7 or 9, all inhibitory activities were decreased to about one third of their original levels. Plasma proteins were hydrolyzed by pepsin, but the inhibitory activity remained about 50% of its original level. We concluded that it is possible to develop food materials having protease inhibitory activity from plasma proteins.

(Received Apr. 14, 1992)

屠殺された牛、豚から得られる血漿蛋白質の利用の必要性が広く認識されつつある¹⁾。それに伴い、血漿蛋白質の乳化特性などの加工特性の解明も進められており²⁾、食品への利用も可能になっている。しかし、単なる増量材的な使用では付加価値に乏しく、経済的な問題は依然として解決されない。そのため、血漿蛋白質にしか認められない機能を活用した利用方法の開発が必要となっている。

血漿蛋白質中には、血液凝固の制御や織溶に関連して多くのプロテアーゼやその阻害蛋白質が存在しており、これらの多くは、生化学的な立場から性質が明らかにされている³⁾。しかし、血漿蛋白質を食品素材として利用する際に、これらの機能が加工工程及び貯蔵中にどのような影響を及ぼすのかに関しては、明らかにされていない。

本研究では、プロテアーゼ阻害蛋白質について、加工工程での活性の変化を明らかにし、これを食品の加工中

および貯蔵中のプロテアーゼによる品質低下の防止に役立てることを検討した。

実験方法

1. 材料

(1) 血漿蛋白質の調製

血漿蛋白質は、前報²⁾と同様に豚血液から調製し、凍結乾燥したものを試料とした。

(2) 酵素および基質

トリプシン (T-8253)、 α -キモトリプシン (C-4129) およびエラスターゼ (E-1250)、は Sigma 社製を用いた。合成基質の $N\alpha$ -benzoyl-DL-arginine- p -nitroanilide (BANA, B-4875)、 N -benzoyl-L-tyrosine- p -nitroanilide (BTNA, B-6760) および N -succinyl-(L-Ala)₃- p -nitroanilide (Suc-(Ala)₃-NA, S-4760) は Sigma 社製を用いた。

* 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

(3) その他の蛋白質

全卵粉, 卵白粉, 卵黄粉, ホエー粉 (サンラクト N) (以上太陽化学), カゼイン粉 (C-5890), 大豆トリプシンインヒビター (T-9128), 卵白トリプシンインヒビター (T-9253) (以上 Sigma 社) を用いた。

2. プロテアーゼ阻害活性の測定

(1) トリプシン阻害活性

ERLANGER らの方法⁴⁾に準じて行った。基質溶液として, BANA 43.5 mg を 1 ml のジメチルスルホキシドに溶解させ, これを 20 mM CaCl₂ を含む 50 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 8.2) で全量を 100 ml にした。酵素溶液として, トリプシンを 0.02% となるように 1 mM HCl に溶液させた。試料を 0.01%, 0.1%, 1% または 2% となるように 50 mM 酢酸ナトリウム溶液に溶解させた。

試料溶液 0.25 ml と酵素溶液 0.25 ml を混合し, これに基質溶液 5 ml を加え, 30℃ で 10 分間インキュベートした。その後, 30% 酢酸を 1 ml 加え反応を停止させ, 410 nm の吸光値を測定し, 遊離した *p*-nitroaniline を定量した。また, ブランクとして試料溶液のかわりに同量の蒸留水を用いて測定を行った。

$$\text{阻害活性 (\%)} = \left\{ 1 - \frac{(\text{試料の OD}_{410})}{(\text{ブランクの OD}_{410})} \right\} \times 100$$

とした。

(2) キモトリプシン阻害活性

KANAMORI らの方法⁵⁾に準じて行った。基質溶液として, BTNA 50 mg を 5 ml の *N*, *N'*-ジメチルホルムアミドに溶解させ, これを 10 mM CaCl₂ を含む 25% メタノール, 100 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で全量を 100 ml にした。酵素溶液として, キモトリプシンを 0.05% となるように 1 mM HCl に溶解させた。試料は, 0.1% または 1% となるように 20 mM CaCl₂ を含む 50 mM 酢酸ナトリウム溶液に溶解させた。

反応は, トリプシンの場合と同様に行い, 阻害活性も同様に算出した。

(3) エラスターゼ阻害活性

BIETH らの方法⁶⁾に準じて行った。基質溶液として, Suc-(Ala)₃-NA 56.43 mg を 1 ml の *N*-メチルピロリドンに 60℃ で溶解させ, これを 200 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で全量を 125 ml にした。酵素溶液として, エラスターゼ (20.4 mg protein/ml, 91 units/mg protein) を 200 mM トリス-HCl 緩衝液 pH 8.0 で 78.8 倍に希釈し, 1 mM 溶液とした。試料

は, 0.1% または 1% となるように 200 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解させた。

試料溶液 1.25 ml と酵素溶液 1.25 ml を混合し, これに基質溶液 1.25 ml を加え, 30℃ で 10 分間インキュベートした。その後, 酢酸を 0.1 ml 加え反応を停止させ, 410 nm の吸光値を測定した。

阻害活性はトリプシンの場合と同様に算出した。

3. 血漿蛋白質の分画

血漿蛋白質のイオン交換クロマトグラフィーによる分画を前報⁷⁾同様に行い, 5 つの画分 (A1 から A5) に分画し, 凍結乾燥したものを活性の測定に用いた。

4. 血漿蛋白質の酸, アルカリによる変性

血漿蛋白質を蒸留水に 1% (w/v) となるように溶解させ, この溶液の pH を 2 から 10 に, 1 N NaOH または 1 N HCl で調節した。これを 30℃ で 3 分間インキュベートし, その後 pH 7 に調節し, 活性の測定に用いた。

5. 血漿蛋白質の加熱による変性

血漿蛋白質を蒸留水に 1% (w/v) となるように溶解させ, この溶液の pH を 3, 7 または 9 に, 1 N NaOH または 1 N HCl で調節した。これを 80℃ で 30 分間加熱処理し, その後直ちに室温へ戻し, pH を 7 に調節した後, 活性の測定に用いた。

6. 血漿蛋白質のペプシンによる分解

血漿蛋白質のペプシンによる分解を前報⁸⁾同様に行った。酵素/基質=1/1000 (W/W), pH 3.7 で 0 から 120 分間反応させ, 凍結乾燥したものを活性の測定に用いた。

実験結果および考察

1. 血漿蛋白質のプロテアーゼ阻害活性

Table 1 に血漿蛋白質と他の蛋白質のプロテアーゼ阻害活性を示した。血漿蛋白質のトリプシン阻害活性は, 2% 溶液では 80% 以上であるが, 濃度が低下すると阻害活性も低下し, 0.1% 溶液では阻害活性は 2% 以下であった。同じ濃度の全卵粉, 卵白粉と比較すると, 血漿蛋白質の阻害活性は低かった。牛乳にもトリプシン阻害活性があり, 初乳の活性は高く, 次第に活性が低下していくことが報告されている⁹⁾。今回の測定では, ホエー粉の阻害活性は極めて低い値を示し, カゼイン粉には阻害活性は全く認められなかった。

血漿蛋白質の濃度によるキモトリプシンの阻害活性の変化は, トリプシンの場合と同様の傾向を示した。エラスターゼの阻害活性は, 血漿蛋白質濃度が 0.1% になっても 2% の場合と同程度の値を示した。いずれの酵素に

Table 1 Protease inhibitory activities of various proteins

	Concentration (%)*	Inhibitory activity (%)		
		Trypsin	α -Chymotrypsin	Elastase
Plasma	2	83.6	29.4	54.6
	1	43.0	15.5	51.3
	0.1	1.6	2.5	58.6
Whole egg	1	98.9	—	—
Egg white	1	99.1	57.3	84.4
Egg yolk	1	25.8	—	—
Whey	1	1.8	—	—
Casein	1	0.0	—	—
Trypsin inhibitor	0.1	100	83.0	51.9
(from Soybean)	0.01	82.3	—	—
Trypsin inhibitor	1	—	48.8	—
(from Egg white)	0.1	99.9	—	96.4
	0.01	46.5	—	—

* : Concentration of each sample solution.

Reaction mixture consisted of 0.25 ml of the sample solution, 0.25 ml of enzyme solution and 5.0 ml of substitute solution.

Conditions: incubation at 30°C for 10 min at pH 8.2 (trypsin) or pH 8.0 (α -chymotrypsin, elastase).

Inhibitory activity was estimated from the residual protease activity in the reaction mixture incubated with the inhibitor, and expressed as per cent inhibition (I) of the control activity using the following equation: $I(\%) = (1 - A'/A) \times 100$ where A' and A are the respective absorbance at 410 nm (the amount of *p*-nitroaniline released from the substitute by enzymatic hydrolysis) with and without the inhibitor.

対する阻害活性も同濃度の卵白粉よりも低い値であった。

卵白のトリプシン阻害活性が卵の保存性向上に役立っていることが知られている⁹⁾。血漿蛋白質のプロテアーゼ阻害活性を利用し、食品の保存性向上に役立てることが可能か、卵蛋白質の阻害活性と比較してみた。その結果、血漿蛋白質のトリプシン阻害は、同濃度の卵白よりは劣っていた。しかし、今回の阻害活性測定系では試料の2%溶液の場合、反応系中での血漿蛋白質濃度は約0.09%となり、この濃度でもトリプシンを約80%阻害していたことから、血漿蛋白質を食品へ混合した場合も阻害活性は十分に発現されると考えられる。今回の実験では、血漿蛋白質の濃度が高くなると溶液に濁りが生じて測定に支障をきたすため、試料溶液としての濃度が2%、つまり、反応系中での濃度としては0.09%までしか測定を行わなかった。一方、血漿中の蛋白質濃度は約8%であり、今回の測定系より高濃度の系ではトリプシ

ンなどの阻害活性がさらに高くなると考えられる。

以上の結果から、血漿蛋白質のプロテアーゼ阻害活性を食品へ利用することが可能であると考えられた。以下ではさらに、血漿蛋白質に対していくつかの処理を行い、阻害活性の検討を行った。

2. 血漿蛋白質分画物のトリプシン阻害活性

Table 2 に血漿蛋白質の分画物のトリプシン阻害活性を示した。A 1, A 2 画分には阻害活性はなく、A 3 画分に阻害活性があることが示された。また、A 4 画分にはわずかに阻害活性が認められた。なお、前報の A 5 画分は、溶解性が低いため、阻害活性の測定は行わなかった。

血漿蛋白質中のセリン型プロテアーゼ阻害蛋白質に関しては既にその性質の多くが解明されている³⁾。そのうち、 α_1 -アンチトリプシン、 α_2 -マクログロブリンなどの蛋白質は、 α -グロビン画分に存在している¹⁰⁾。A 3 画分は、この α -グロビン画分に相当するもので、A 3 画分

Table 2 Protease inhibitory activities of fractionated plasma proteins

	Inhibitory activity (%)
Whole plasma	43.0
Fraction A 1	0.3
Fraction A 2	0.0
Fraction A 3	65.6
Fraction A 4	16.1
Fraction A 5	—

Experimental conditions and inhibitory activity are the same as in Table 1.

—: not measured because of the precipitation.

の阻害活性が高いことは、これらの阻害蛋白質に起因していると考えられる。

このように、イオン交換クロマトグラフィーによる分画によって阻害活性の高い素材を調製することが可能であった。他の画分のうち、A1 は γ -グロブリン、A2 はトランスフェリン、A4 は血清アルブミンに富むことが示されている⁷⁾。A3 画分に対してはプロテアーゼ阻害活性を活用した利用方法を検討し、A3 以外の画分はそれぞれの蛋白質の特性を活用した利用方法を考えることで、血漿蛋白質全体としての利用性の向上が計られるものと考えられる。

3. 阻害活性の安定性

Fig. 1 に pH 2 から 10 において試料溶液をインキュベートしたときのトリプシン阻害活性の変化を示した。血漿蛋白質に沈澱が生じたため、pH 5, pH 6 において処理した試料については測定しなかった。トリプシン、キモトリプシンについては、血漿蛋白質を酸性 pH にさらすと阻害活性が低下することが示された。トリプシン阻害活性は、pH 2.0 では、pH 7.0 の約 40% まで低下した。血漿蛋白質をアルカリ性 pH にさらした場合、トリプシン阻害活性では増加が認められた。エラスターゼ阻害活性に関しては、pH の影響は少なかった。

今回の結果からは、トリプシンの阻害を目的とする場合、酸に対しては不安定であり、アルカリ性の方が阻害活性が安定であることが示された。また、阻害活性への pH の影響は、阻害されるプロテアーゼの種類によって傾向が異なっていた。これらの結果から、利用の際には、阻害を目的とするプロテアーゼの特性をよく検討することが重要であることが示された。

Fig. 1 Changes in protease inhibitory activity during acid or alkaline treatment

Experimental conditions and inhibitory activity are the same as in Table 1. The activities of the sample treated at pH 5 and 6 were not measured because of the precipitation of plasma proteins.

●: trypsin
■: α -chymotrypsin
○: elastase

Fig. 2 Changes in trypsin inhibitory activity during heat treatment

Experimental conditions and inhibitory activity are the same as in Table 1.

■: pH 3 ●: pH 7 ○: pH 9

Fig. 2 に加熱処理によるトリプシン阻害活性の変化を示した。pH 3, 7, 9 のいずれにおいても 80°C, 5 分間の加熱で阻害活性は約半分に低下した。30 分加熱後においては、阻害活性は約 3 分の 1 となった。

食品加工において、殺菌の目的で血漿蛋白質をあらかじめ加熱処理することが考えられる。今回の結果からは、80°C 30 分間の加熱処理後も血漿蛋白質のトリプシンに対する阻害活性が残っていることが示された。しかし、pH 3 で加熱によっては阻害活性は約 7% となり、トリプシンに対する阻害効果はほとんど期待できない低い値となった。

血漿蛋白質中には、9 種類の血漿凝固の制御に関与するプロテアーゼ阻害蛋白質の存在が知られている³⁾。これらのうち、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -アンチキモトリプシンは熱や酸に不安定であり、 α_2 -マクログロブリンは熱に比較的安定であることが知られている¹⁰⁾。今回の阻害活性の測定結果は、このように性質の異なるいくつかの阻害蛋白質の阻害スペクトルの総合されたものと考えられる。

Fig. 3 に血漿蛋白質のペプシン分解によるトリプシン阻害活性の変化を示した。血漿蛋白質の 120 分間分解物においても、分解前の 50% 以上の阻害活性が残っていた。

前報⁹⁾において示されたように、血漿蛋白質をペプシンで 120 分間加水分解したものは、蛋白質の分子量はほとんどが 25 000 以下になった。このような分解物でもトリプシンに対する阻害活性は残っており、阻害のためには必ずしもインタクトな蛋白質を必要とするわけでは

Fig. 3 Change in trypsin inhibitory activity during peptic digestion

Experimental conditions and inhibitory activity are the same as in Table 1.

なく、血漿蛋白質の分解物でもある程度の阻害活性がのこっていることが示された。

一方このことは、血漿蛋白質を食品とした場合、トリプシンに対する阻害活性を持ったまま胃を通過する可能性も示しており、血漿蛋白質を食べたときの問題点として今後検討する必要があると考えられる。

以上のことを通して、血漿蛋白質のプロテアーゼ阻害活性を食品へ利用する可能性が示された。阻害活性を利用して、食品の貯蔵性の向上、特に、プロテアーゼによって物性などが変化する素材の品質保持などへの利用の可能性が考えられる。今後は、阻害を目的とするプロテアーゼの性質を明らかにし、血漿蛋白質はどのような条件下で利用が可能かを確認して、実用化を進めていく必要がある。

要 約

血漿蛋白質のプロテアーゼ阻害活性を、食品の加工中および貯蔵中におけるプロテアーゼによる品質低下の防止に役立てることを検討した。

1) 血漿蛋白質はトリプシン、 α -キモトリプシン、エラスターゼを阻害したが、阻害活性は、同濃度の卵白粉よりも低かった。

2) 血漿蛋白質をイオン交換クロマトグラフィーで分離したところ、阻害活性の高い画分を調製することができた。

3) 血漿蛋白質の阻害活性は酸に対しては不安定であった。また、80°C 30 分間の加熱では、pH 3, 7, 9 いずれにおいても阻害活性は、約 3 分の 1 に低下した。ペプシンにより血漿蛋白質の加水分解を行ったが、阻害活性は約 50% 残っていた。

4) 以上のことから、阻害を目的とするプロテアーゼの性質を明らかにし、pH、加熱処理などの条件を適切に設定したり、分離により阻害活性の高い素材を調製することで、血漿蛋白質のプロテアーゼ阻害活性を利用した食品素材の開発が可能と考えられた。

豚血液の採取に当たってお世話頂いた、農林水産省畜産試験場 中井博康室長に感謝いたします。阻害活性の測定方法についてご教示頂いた、農林水産省北陸農業試験場 大坪研一室長に感謝いたします。

文 献

- 1) 佐藤 泰：肉の科学, 28 (1), 17 (1987).
- 2) 斎藤昌義・石橋恵美子・平 春枝：日食工誌, 37,

- 805 (1990).
- 3) 鈴木宏治: 統生化学実験講座 8 血液 (下), 日本生化学会編 (東京化学同人, 東京), p. 557 (1987)
- 4) ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N. and COHEN, W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961).
- 5) KANAMORI, M., IBUKI, F., TASHIRO, M., YAMADA, M. and MIYOSHI, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **439**, 398 (1976).
- 6) BIETH, J., SPIESS, B. and WERMUTH, C.G.: *Biochem. Med.*, **11**, 350 (1974).
- 7) SAITO, M., ICHIKAWA, N. and TAIRA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2831 (1988).
- 8) 斎藤昌義・平 春枝・清水 誠・山内邦男: 日食工誌, **38**, 920 (1991).
- 9) VOGEL, V., TRAUTSCHOLD, I. and WERLE, E.: 蛋白分解酵素インヒビター, 鈴木友二ら訳 (共立出版, 東京), p. 54 (1974).
- 10) VOGEL, V., TRAUTSCHOLD, I. and WERLE, E.: 蛋白分解酵素インヒビター, 鈴木友二ら訳 (共立出版, 東京), p. 57 (1974).
- (平成 4 年 4 月 14 日受理)

新 刊 紹 介

Food Analysis by HPLC

L.M.L. NOLLET 編

本書は Food Science and Technology シリーズの第 52 巻である。本書の特徴は多種多様な食品成分を幅広く取り上げたところにある。全 20 章から成り、総論、アミノ酸、ペプチド、蛋白質、脂質、リン脂質、炭水化物、ビタミン、有機酸、マイコトキシン等、添加物、残留抗生物質、残留農薬、アルコール飲料の苦味成分とフェノール成分等、有機塩基、ニトロソ化合物、多環芳香族炭化水素、陽イオンと陰イオン等について記してある。試料の詳細な調製法と分析条件が述べてあり、食品化学者がそのまま利用できる内容となっている。(M)

25.5 × 18.5 cm, 759 頁, 1992 年刊, 199 ドル

Marcel Dekker, Inc.

270 Madison Avenue, New York, NY 10016

ISBN : 0-8247-8623-8