

# ちりめん煮汁のプロテアーゼ処理と アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性\*

松浦 靖\*<sup>1</sup>・水谷 政美\*<sup>2</sup>

Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity of Treating Chirimen Broth by Various Proteases

Yasushi MATSUURA and Masami MIZUTANI

ちりめん煮汁に含まれるたんぱく質 (0.4%) に、たんぱく質分解酵素あるいは消化酵素を作用させ、処理した煮汁のアンジオテンシン I 変換酵素 (以下、ACEと表記) 阻害活性について検討した。その結果、たんぱく質分解酵素を作用させた全ての煮汁でACE阻害活性が発現する傾向がみられ、*Bacillus stearothermophilus*由来のプロテアーゼS「アマノ」G (以下、PSGと表記) を作用させた煮汁に最も強い活性が認められた。しかし、このPSGを作用させた煮汁に消化酵素 (ペプシン、パンクレアチン等) を作用させたところ、ACE阻害活性が消滅したため、消化器官で消化酵素の影響により失活する可能性が高いと推察された。

そこで、消化酵素のペプシンやパンクレアチンをちりめん煮汁に単独で作用させたところ、高いACE阻害活性が発現した。さらにペプシンを作用させた煮汁にパンクレアチンを、また、パンクレアチンを作用させた煮汁にペプシンを作用させてもACE阻害活性を維持していた。このことから、ちりめん煮汁の消化酵素処理により発現したACE阻害活性は、消化器官で消化酵素の影響を受けにくいと推察された。

キーワード：ちりめん、煮汁、アンジオテンシン I 変換酵素、たんぱく質分解酵素、消化酵素

## 1 はじめに

本県の特産品であるちりめんの加工プロセスから排出される大量の煮汁には、タウリンなどの機能性成分やグルタミン酸、イノシン酸等の呈味成分を多く含んでいることが確認されているが、現状では廃棄されており、食品としての有効利用が望まれている。

本研究では、ちりめん煮汁に含まれるたんぱく質にたんぱく質分解酵素あるいは消化酵素を作用させ、処理した煮汁の機能性強化について検討したので報告する。

## 2 実験方法

### 2-1 供試試料

ちりめん加工時に排出される煮汁を、県内加工

場にて採取した。採取後は、ちりめん煮汁をナイロン製の袋に小分けし、-20℃の冷凍庫で保存した。試料は用時、解凍して用いた。

### 2-2 供試酵素

ちりめん煮汁に含まれるたんぱく質を分解するにあたり、表1に示した17種類のたんぱく質分解酵素 (微生物や植物由来の実用化された酸性プロテアーゼ5種類、中性プロテアーゼ12種類) を用いた。これらは、できるだけ酵素の起源が異なり、また、実用時を考慮して、ちりめん煮汁のpH域で反応が進むものを使用した。

### 2-3 一般成分分析

ちりめん煮汁の一般成分は、五訂日本食品標準成分表分析マニュアル (科学技術庁資源調査会食品成分部会編) に準じて分析した<sup>1)</sup>。

### 2-4 ちりめん煮汁の酵素処理

試験管にちりめん煮汁を10g取り、各種たんぱく質分解酵素を0.1% (W/W) 加え、45℃で1時間

\* 海洋性バイオマスの有効利用技術の開発 (平成19年度県北都市エリア産学官連携促進事業)

\*1 食品開発部

\*2 応用微生物部

振とうした。反応後、沸騰湯浴中で10分間加熱処理により反応を停止させ、4,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を酵素分解試料液とした。

表 1 供試酵素剤一覧

番号	酵素種類	商品名	起源	酵素メーカー
1	酸性プロテアーゼ	ニューラーゼF3G	<i>Rhizopus niveus</i>	天野エンザイム
2	酸性プロテアーゼ	モルシン F	<i>Aspergillus saitoi</i>	キッコーマン
3	酸性プロテアーゼ	スミチーム AP	<i>Aspergillus niger</i>	新日本化学工業
4	酸性プロテアーゼ	デナブシン 2P	<i>Aspergillus niger</i>	ナガセケムテックス
5	酸性プロテアーゼ	プロテアーゼYP-SS	<i>Aspergillus niger</i>	ヤクルト薬品工業
6	中性プロテアーゼ	プロテアーゼ A「アマノ」G	<i>Aspergillus oryzae</i>	天野エンザイム
7	中性プロテアーゼ	プロテアーゼ N「アマノ」G	<i>Bacillus subtilis</i>	天野エンザイム
8	中性プロテアーゼ	プロテアーゼ S「アマノ」G	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	天野エンザイム
9	中性プロテアーゼ	プロメライン F	<i>Ananas comosus M</i>	天野エンザイム
10	中性プロテアーゼ	スミチーム TP	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	新日本化学工業
11	中性プロテアーゼ	スミチーム FP	<i>Aspergillus oryzae</i>	新日本化学工業
12	中性プロテアーゼ	スミチーム LPL	<i>Aspergillus oryzae</i>	新日本化学工業
13	中性プロテアーゼ	デナブチーム AP	<i>Aspergillus oryzae</i>	ナガセケムテックス
14	中性プロテアーゼ	パンチダーゼ NP-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	ヤクルト薬品工業
15	中性プロテアーゼ	プロテックス7L	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	ジェネンコア協和
16	中性プロテアーゼ	IP酵素	<i>Aspergillus sojae</i>	キッコーマン
17	中性プロテアーゼ	パバイン		和光純薬

## 2-5 ACE阻害活性測定

酵素分解試料液のACE阻害活性測定は、HORIUCHIら<sup>3), 4)</sup>の方法に準じて評価した。

すなわち、試料溶液70  $\mu$ lとACE溶液 (0.05unit/s/ml, Sigma製) 100  $\mu$ lを37°Cで5分間インキュベートした後、12.5mmol/l Bz-Gly-His-Leu (株ペプチド研究所製) 30  $\mu$ lを加えて、37°Cで30分間反応させた。反応後は、3%メタリル酸溶液を加え、反応を停止させた。反応液中に生成した馬尿酸は、高速液体クロマトグラフィーにより、表2の条件で定量し、ACE阻害率を求め、最も活性が高くなる酵素を選抜した。

なお、ACE阻害率は、次式により求めた。

$$\text{ACE阻害率 (\%)} = \{ (B-A) / (B-C) \} \times 100$$

A : 試料溶液を用いた場合の馬尿酸のピーク面積  
B : 試料溶液の代わりに蒸留水を用いた場合の馬尿酸のピーク面積

C : 試料溶液にあらかじめ反応停止液を加えた場合の馬尿酸のピーク面積

表 2 高速液体クロマトグラフィー測定条件

HPLC	GULLIVER PU-980 (日本分光製)
カラム	COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 $\times$ 150mm, ナカライテスク製)
移動相	A 10mM potassium phosphate buffer (pH2.8) B 99.8% acetonitrile (A:B = 80:20)
流速	0.5ml/min
カラム温度	40°C
検出波長	228nm

## 2-6 PSG処理煮汁の消化酵素作用後のACE阻害活性

PSGで処理した煮汁が、消化器官で消化酵素の影響を受けず、活性を維持できるか検討するため、瀧口ら<sup>5), 6)</sup>の方法により消化酵素を作用させ、煮汁のACE阻害率を求めた。

### 2-6-1 ペプシン耐性試験

pH無調整の煮汁15gにPSGを0.1% (W/W) 加え、45°Cで1時間振とうした。反応後、沸騰湯浴中で10分間加熱処理により反応を停止させ、4,000回転で10分間遠心分離し、PSG処理煮汁を得た。PSG処理煮汁は、10倍希釈し、次の試験に供した。

耐性試験に用いる8% (W/V) ペプシン溶液は、煮汁と同濃度の1.5%食塩水10mlにペプシン (和光純薬工業製) を溶解させ、3mol/l HClでpHを2.0に調整した。耐性試験は、10倍希釈したPSG処理煮汁 (3mol/l HClでpH2.0に調整) に8% (W/V) ペプシン溶液を1%添加し、37°Cで1時間振とうした。反応後、沸騰湯浴中で10分間加熱処理により反応を停止させ、4,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を得た。得られた液は3mol/l NaOHでpHを7.0とし、ACE阻害率を求めた。

### 2-6-2 パンクレアチン等耐性試験

耐性試験に用いる1% (W/V) パンクレアチン、トリプシン溶液は、煮汁と同濃度の1.5%食塩水10mlにパンクレアチン、トリプシン (ともに和光純薬工業製) をそれぞれ溶解させ、3mol/l NaOHでpHを7.0に調整した。耐性試験は、2-6-1でペプシン処理したPSG煮汁10gに1% (W/V) パンクレアチン、トリプシン溶液及び胆汁末0.2%を添加し、窒素ガス置換した嫌気条件下で37°Cに保持して、1時間振とうした。反応後、沸騰湯浴中で10分間加熱処理により反応を停止させ、4,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を得て、ACE阻害率を求めた。

## 2-7 消化酵素を作用させたちりめん煮汁のACE阻害活性

試験管にpH2.0に調整したちりめん煮汁とpH7.0に調整したちりめん煮汁をそれぞれ10g取り、前者はペプシンを、後者はパンクレアチンを0.1%(W/W)加え、37℃で1時間振とうした。反応後、沸騰湯浴中で10分間加熱処理により反応を停止させ、4,000回転で10分間遠心分離し、上澄液をpH7.0に調整後、ACE阻害率を求めた。次に、上記で得られたペプシン処理煮汁7gにパンクレアチンを、パンクレアチン処理煮汁(3mol/l HClでpH2.0に調整)7gにペプシンを0.1%(W/W)加え、37℃で1時間振とうした。反応後、沸騰湯浴中で10分間加熱処理により反応を停止させ、4,000回転で10分間遠心分離し、上澄液をpH7.0に調整後、ACE阻害率を求めた。

### 3 結果および考察

#### 3-1 ちりめん煮汁の一般成分

ちりめん煮汁の一般成分を表3に示す。炭水化物や脂質はほとんど含まれておらず、たんぱく質が0.4g/100g含まれていた。

また、灰分が2.3g/100g含まれていたのは、ちりめんを茹で揚げる時に食塩を添加するためと考えられた。

表3 ちりめん煮汁の一般成分

水分	たんぱく質	炭水化物	脂質	灰分
97.3	0.4	0	0	2.3
g/100g ちりめん煮汁				

#### 3-2 たんぱく質分解酵素処理した煮汁のACE阻害活性

ちりめん煮汁にたんぱく質分解酵素を作用させ、発現した煮汁のACE阻害率を図1に示した。

酸性プロテアーゼでは、酵素の至適pHが2.5~3.0と低いことから、煮汁のpHが6.3に対し、酵素反応が進みにくく、ACE阻害活性が低くなるのがわかった。

一方、中性プロテアーゼでは、煮汁のpHが酵素の至適pHに近いことため酵素反応がよく進み、比較的ACE阻害活性が高くなった。中でも*Bacillus*属由来のたんぱく質分解酵素で処理した煮汁に強いACE阻害活性が生じており、特に、*Bacillus stea rothermophilus*由来のプロテアーゼS「アマノ」Gで処理した煮汁に最も強い活性が認められた。以上のことから、今後のたんぱく質分解酵素処

理によるACE阻害活性試験については、プロテアーゼS「アマノ」Gを用いることとした。

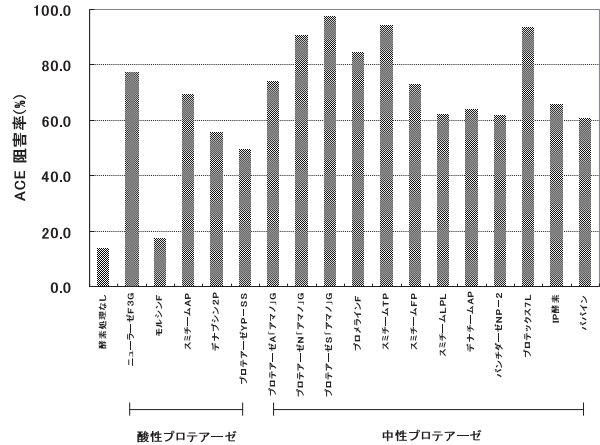


図1 たんぱく質分解酵素処理煮汁のACE阻害活性

#### 3-3 PSG処理煮汁の消化酵素作用後のACE阻害活性

PSG処理した煮汁に、消化酵素を作用させ、残存するACE阻害率を求めた結果を図2に示した。ちりめん煮汁にPSGを作用させることでACE阻害率が高く発現したが、その煮汁にペプシンを作用させることで、ACE阻害率が72.3%から39.2%と約半分に低下し、ペプシンによる影響を大きく受けることがわかった。さらに、ペプシンを作用させた後の煮汁にパンクレアチン等を作用させたところ、ACE阻害率がほとんど消滅したため、PSG処理により発現したACE阻害活性は消化器官で消化酵素の影響を受け、失活する可能性が高いと推察された。

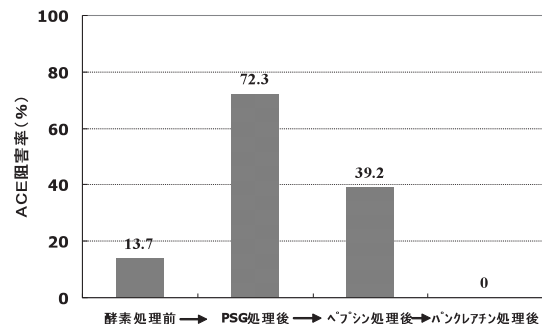


図2 消化酵素を作用させたPSG煮汁のACE阻害活性

#### 3-4 消化酵素を作用させたちりめん煮汁のACE阻害活性

ちりめん煮汁に消化酵素のペプシン、パンクレ

アチンをそれぞれ作用させたときのACE阻害率を図3に示した。ペプシンおよびパンクレアチンを作用させた煮汁に95.8%, 71.2%と高いACE阻害活性が発現することを確認した。さらに、ペプシンを作用させた煮汁にパンクレアチンを、パンクレアチンを作用させた煮汁にペプシンを作用させても、85.8%, 72.5%とACE阻害活性が維持された。このことから、ちりめん煮汁を消化酵素処理することにより、発現したACE阻害活性が消化器官で消化酵素の影響を受けない可能性が示唆された。

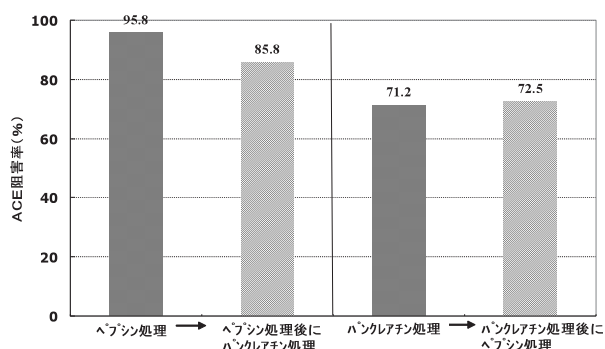


図3 消化酵素を作用させたちりめん煮汁のACE阻害活性

#### 4 まとめ

ちりめん煮汁にたんぱく質分解酵素あるいは消化酵素を作用させ、処理した煮汁のACE阻害活性について検討した結果、以下のことがわかった。

- 1) ちりめん煮汁そのものにはほとんどACE阻害活性が見られなかった。
- 2) ちりめん煮汁のたんぱく質分解酵素処理により高いACE阻害活性が発現したが、消化器官で消化酵素の影響を受け、失活する可能性が高いと推察された。
- 3) ちりめん煮汁に消化酵素のペプシンやパンクレアチンを作用させたところ、高いACE阻害活性が発現した。

なお、ペプシンを作用させた煮汁にパンクレアチンを、パンクレアチンを作用させた煮汁にペプシンを作用させてもACE阻害活性を維持していた。

#### 5 謝辞

本研究の推進にあたり試料の提供に御協力いただいた山西水産(株)、(有)浜田水産、また、酵素剤の

提供に御協力いただいた天野エンザイム(株)、キッコーマン(株)、ジェネンコア協和(株)、新日本化学工業(株)及びびなガセケムテックス(株)に感謝申し上げます。

#### 6 参考文献

- 1) 小玉誠, 江口洋, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **45**, p127-130 (2000)
- 2) 小玉誠, 日高照利, 河野幹雄, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **47**, p97-101 (2002)
- 3) M. HORIUCHI, K. FUJIWARA, T. TERASHIMA and T. ISO, *J.chromatogr.*, **233**, p123-130(1982)
- 4) 道島俊英, 林美央, 勝山陽子, 附木貴行, 日比野剛, 川嶋正男, 矢野俊博, 榎本俊樹, 石川県工業試験場研究報告, **53**, p49-54 (2004)
- 5) 瀧口隆一, 鈴木豊, 腸内細菌学雑誌, **14**, p11-18(2000)
- 6) 木村功, 大島久華, 上枝加代子, 香川典子, 合田奈苗, 香川県産業技術センター研究報告, **4**, p55-57(2004)