

アコヤガイ内臓の有効利用に関する研究

苔庵泰志*，山崎栄次*，栗田 修*，中林 徹*，坪内一夫*

Research on the Effective Utilization of Pearl Oyster Viscus

by Yasushi KOKEAN, Eiji YAMAZAKI, Osamu KURITA,
Toru NAKABAYASHI and Kazuo TSUBOUCHI

We studied the effective utilization for viscus of pearl oyster (*Akoyagai: Pinctada fucata martensii*) which was wasted in the process of pearl manufacturing. The contents of moisture, protein, lipid, carbohydrate, and ash in pearl oyster viscus were 87.4%, 7.4%, 0.7%, 1.9%, and 2.6%, respectively. We examined the utilization of protein so that protein is main component in the dry matter of the viscus. Then peptides were prepared from pearl oyster the viscus by treatment with proteases. Angiotensin converting enzyme(ACE) is one of the enzymes related to hypertension in living life. Intact proteins inhibited 0.9% of ACE activity, however the peptides inhibited that of about 90%. The peptide prepared by pepsin was separated three fractions by gel filtration on Superdex pg30. Molecular weights in appearance of each fraction were about 10kDa, 1kDa, and below 1kDa, respectively. Inhibition for ACE activity by the fractions were about 30%, 45% and 25%, respectively.

Key word: pearl oyster, peptide, angiotensin converting enzyme

1. はじめに

アコヤガイ (*Pinctada fucata martensii*) を用いた養殖真珠の作出は、1893年に世界で初めて三重県の英虞湾で成功し、真珠養殖は三重県志摩地方の主要な産業となった。現在、三重県の真珠生産量は愛媛、長崎に次いで第3位であるが、真珠販売額は全国第1位であり¹⁾、志摩地方で有数の産業として、国内外を問わず通用する特産品である。英虞湾を中心とする生産現場では、年間約800tの貝殻が排出され、貝殻に付着している有機物質の腐敗等により、地域では悪臭に悩まされていることから、適切な処理が望まれている。また、貝肉についても、貝柱が真珠漬に使われる程

度で、残りの多くが廃棄物となり、有効な利用法が確立されていない。

アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme:ACE)は、ヒトをはじめ動物の生体中で血圧上昇に関わる酵素の一つである。このため、ACE活性が阻害されると血圧上昇は抑制される。近年、食品由来の様々な素材からACE活性阻害ペプチド等の物質が分離され注目を集めている²⁾⁻⁴⁾。本研究では、アコヤガイの廃棄物中に含まれるタンパク質からペプチドを調製し、貝肉の有効利用と食品等への応用の可能性について、検討を行った。

2. 材料と実験方法

2.1 原材料

平成15年、及び16年2月に英虞湾で収穫した真珠を取り出したあとの貝肉部分を、研究用試

* 生物食品グループ

料として-30℃に凍結保存し、使用時に解凍して用いた。

2.2 アコヤガイ貝肉の一般成分分析

水分は、乾熱器で105℃、3時間試料を乾燥させた。タンパク質はケルダール法に従って窒素量を分析し、得られた値とタンパク係数(5.55)から計算した。粗脂肪はソックスレー法に従ってエーテル抽出により分析した。灰分は電気炉で600℃、1時間、灰化処理を行って重量を測定した。炭水化物はサンプル重量からその他の成分の値を差し引いた算術計算で求めた⁵⁾。

2.3 タンパク質およびペプチドの調製

ナガセ生化学工業製の4種類の微生物プロテアーゼとパパイン、及びペプシンを用いてアコヤガイ内臓タンパク質からペプチドを調製した。ペプチド調製に用いた酵素の種類と至適pH、至適温度を表1に示した。

表1 用いたプロテアーゼの至適条件

酵素名(商品名)	至適pH	至適温度(℃)
デナブシン 2P	3.0	40
ピオプラーゼ 15FG	7.0	30
XP-415	3.0	30
デナチーム AP	7.0	40
パパイン	7.0	55
ペプシン	2.0	37

アコヤガイ貝肉 977g を 120℃、50 分間オートクレーブして内因性のプロテアーゼを失活させた。それぞれ 10g を取り分け、蒸留水 50ml を加えた後に、ポリトロンミキサー (PT10-35, KINEMATIKA AG) でホモジナイズした。1N 塩酸又は 1N 水酸化ナトリウム溶液で、それぞれ用いた酵素の至適 pH に調整し、至適温度で、16 時間酵素処理した。処理後、沸騰湯浴中に 15 分間保ち反応を止めた。得られた溶液は 10,000xg で 10 分間遠心分離後、上清を NO.5C の濾紙でろ過し、そのろ液を ACE 阻害活性測定に用いた。タンパク質濃度の定量は Bradford 法⁶⁾によって行った。

2.4 ACE 阻害活性の測定

ACE 活性測定は、Cushman らの方法⁷⁾に従

って行った。すなわち、Hip-His-Leu を基質として ACE を作用させ、遊離した馬尿酸を酢酸エチルで抽出し、減圧乾燥後、蒸留水に溶解して 226nm での吸光度を測定した。また、試料のタンパク質濃度は、80µg/ml に調製して活性測定を行った。

2.5 ACE 活性阻害ペプチドの精製

ゲルろ過法 (カラム: アマシャム社 Superdex pg30 High Load16/60) により、ペプシン処理アコヤガイペプチド混合物から、ACE 活性阻害作用を持つ画分を部分精製した。得られた ACE 活性阻害画分は凍結乾燥した。

3. 結果と考察

3.1 一般成分分析

水分 87.4%、タンパク質 7.4%、粗脂肪 0.7%、炭水化物 1.9%、灰分 2.6% であった。水分を除いた成分ではタンパク質が最も多く含まれ、有効利用を図る成分として有望であると考えた。そこで、タンパク質を抽出して、機能性素材としての利用法について検討した。

3.2 タンパク質の抽出及びペプチドの調製

表2 アコヤガイタンパク質 ACE 活性阻害率

酵素(商品名)	ACE 活性阻害率(%)
未処理	0.9
デナブシン 2P	86.1
ピオプラーゼ 15FG	83.3
XP-415	89.6
デナチーム AP	91.5
パパイン	40.3
ペプシン	87.1

ACE 阻害活性: ペプチド無添加の時の ACE の活性阻害を 0% として示した。

アコヤガイ貝肉から抽出したタンパク質、およびプロテアーゼ処理によって得られたペプチド (80µg/ml) の ACE 活性阻害率を表 2 に示した。アコヤガイタンパク質をプロテアーゼ処理することにより、ACE 阻害ペプチドが効率よく生成することが明らかとなった。藤田²⁾らによると、かつお節の絞り糟を微生物プロテアーゼであるサー

モラシン処理したペプチド液の ACE 阻害活性の IC₅₀ は、29μg/ml (ACE 活性阻害率=29μg/ml のときに活性阻害率が 50%) であるとしている。この数字からも、本研究でのアコヤガイペプチドの ACE 活性阻害の結果は、有用であると考えられる。

食品材料として利用する場合、生体内で血圧上昇抑制効果を失わずに機能する必要がある。そのため、生体内消化酵素の一つであるペプシン処理ペプチドについて精製、素材化の可能性について引き続き検討した。

3. 3 ACE 活性阻害ペプチドの精製

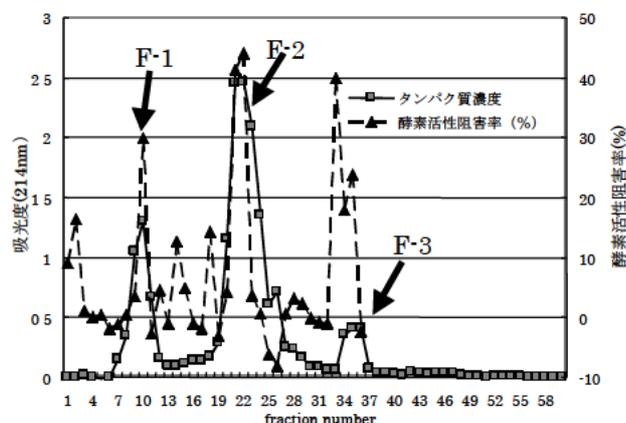


図 1 アコヤガイペプチド(pepsin 処理)のゲルろ過

カラム : Superdex pg30 High Load 16/60 (1.6x60cm) 流速 : 0.8ml/min, フラクション : 5ml/tube, 緩衝液 : Milli-Q 水

ペプシン処理アコヤガイペプチドのゲルろ過の結果を、図 1 に示した。Superdex pg 30 High Load 16/60 を用いたゲルろ過では、ペプシン処理アコヤガイペプチドは、主に 3 つの画分に分離できることがわかった。これら画分の分子量と ACE 活性の阻害率は、分子量 10kDa 前後のピークが約 30% (フラクション 1 : F-1) , 分子量約 1kDa のピークが 45% (フラクション 2 : F-2) , それより分子量の小さいピークが約 25% (フラクション 3 : F-3) となった。生体中で血圧上昇作用に関わる物質であるアンジオテンシン II (AG-II) は、アミノ酸が 8 分子つながったペプチドである。ACE は、前駆体であるアンジオテンシン I (AG-I) から、2 分子のアミノ酸を切り取って AG-I に変換する酵素である。生成したペプチ

ドは、ACE の基質として AG-I と競合する。このためプロテアーゼ処理により、タンパク質処理液の ACE 阻害活性が上がったと考えられる。

ゲルろ過に供した試料溶液のタンパク質の総量は 756μg であったが、凍結乾燥後の重量は F-1 が 80.0μg, F-2 が 52.5μg, F-3 は 5μg となった。ゲルろ過画分の回収率は、凍結乾燥の値から低くなることが予想される。今後素材として利用するためには、大量調製法の検討とペプチドの回収率の向上が課題となると考えられる。

4. まとめ

1) アコヤガイ内臓成分の一般成分分析を行ったところ、その含量はそれぞれ水分 87.4%、タンパク質 7.4%、粗脂肪 0.7%、炭水化物 1.9%、灰分 2.6%であった。

2) アコヤガイ内臓に含まれる、内因性プロテアーゼを失活させた後に 6 種類のプロテアーゼによる処理を行いペプチドを調製した。未処理タンパク質のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性阻害率は 0.9%であったのに対し、プロテアーゼ処理したペプチドではおおよそ 90%前後であった。

3) ペプシン処理ペプチドは、ゲルろ過により 3 つの画分に分離できた。おおよその分子量は、大きい方から 10kDa, 1kDa, 1kD 以下であった。また、ACE 活性の阻害率はそれぞれ、約 30%, 45%, 25%であった。

参考文献

- 1)平成 14 年度農林水産省統計
- 2)藤田裕之, 吉川正明 : “成人病予防食品の開発”. シーエムシー, 167-175 (1998).
- 3)Isono, Y. : “Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from Masai fermented milk”. *Food Sci. Technol., Int.*, 2(4), 213-216 (1996).
- 4)苔庵泰志ほか : “ハタケシメジの投与が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響”. 49(2), 126-129 (2002).
- 5)小原哲二郎ほか 編 : “食品ハンドブック 第 2 版”. 建帛社 (1973) .
- 6)Bradford, M. : “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye

binding". *Anal. Biochem.*, 72, 248-254 (1976).

7)Cushman, D. W. and Cheung, H. S.(1971). :
"Spectrophotometric assay and properties of the
angiotensin-converting enzyme of rabbit lung".
Biochem. Pharmacol., 20, 1637-1648 (1971).