

大豆水抽出残さ“オカラ”からのたん白質の抽出とその利用

ISOLATION AND UTILIZATION OF THE PROTEIN FROM
“OKARA”

山内文男・陳 俊榮・村本光二・岩淵せつ子・浅野三夫

(東北大学農学部)

末綱邦男(下関水産大学校)

Fumio YAMAUCHI¹, Jiun-Rong CHEN¹, Kouji MURAMOTO¹,
Setsuko IWABUCHI¹, Mitsuo ASANO¹ and Kunio SUETSUNA²

¹Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 981

²Shimonoseki University of Fisheries, Shimonoseki 750

ABSTRACT

Okara that is the waste produced from tofu plant contains 4.7% protein fractions per wet base. The okara proteins were fractionated into water-extractable proteins and water-insoluble proteins. After removal of water-soluble proteins (soymilk), the residue was extracted with various solvents; NaCl, urea, and SDS solutions. SDS gel electrophoretic analysis revealed that 0.3 M NaCl extracts composed of a single band of 42 kDa under the nonreducing conditions which was identical with basic 7S globulin (BG). We found that okara was an appropriate material for BG preparation by one-step extraction instead of the previous method [Isolation and characterization of BG have been established by us; *Agric Biol Chem*, 48, 545 (1984)]. Heat treated okara, however, was inadequate for the material of BG because BG became insoluble probably due to the formation of cross linkage through SS bonds. Pepsin digests of BG and water extracted soybean protein were prepared and fractionated into single peptide by HPLC. Among them, the active peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity were screened. One peptide from BG and 4 peptides from water extracted protein digests were obtained. These ACE inhibitory peptides showed the IC₅₀ values ranging 14-53 μ M. The amino acid sequence of the active peptide from BG was Val-Met-Asp-Lys-Pro-Gln-Gly. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 15, 22-27, 1994.

豆腐製造業において多量に産生されるオカラは、これまでは家畜飼料などの需要もあったが、最近では安価な外国産穀物飼料に取って代われ、その処分に費用を要するようになった。そのため関係業界ではオカラの有効利用が重要な問題となっており、いろいろな視点から研究開発が試みられている。筆者らもオカラの有効利用を目的として、まずオカラ成分の見直しを

行ってみた。オカラのたん白質の抽出挙動を検討していたところ、オカラの中から簡単な抽出操作だけで塩基性7Sグロブリン(BG)を極めて高純度で取り出せることを見出した¹⁾。塩基性7Sグロブリンは脱脂大豆を高塩濃度溶液で抽出すると初めて抽出されてくるグロブリンで、筆者らにより見出され、大豆のグロブリンには珍しくメチオニンやシステインを多く含む点で

注目されているたん白質である^{2,3)}。

また、近年大豆たん白質にヒトの健康に関する様々な生体調節機能があることが知られるようになり、健康維持と食事の関係から大豆たん白質に大きな期待が寄せられている。そこで本研究では大豆塩基性 7S グロブリンおよび主要グロブリンの酵素消化物の中からアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害作用を有する機能性ペプチドの分離を目的として、*in vitro* アッセイ系を用いてスクリーニングを行った。その結果、BG の酵素分解物から 1 種、大豆水抽出たん白質の分解物の中から 4 種の ACE 阻害ペプチドを分離したので報告する。これまで、食品由来の ACE 阻害ペプチドとして、カゼイン⁴⁾、トウモロコシ⁵⁾、イワシ筋肉⁶⁾の酵素分解物の中から分離されているが、大豆たん白質分解物⁷⁾についても研究成果が出されつつある。

実験方法

たん白質の調製

大豆水抽出たん白質は脱脂大豆粉に 5 倍量の水を加えて攪拌抽出し、遠心分離した上澄みを水に透析、凍結乾燥して調製した。水抽出たん白質のグロブリン組成は希薄トリス塩酸緩衝液の抽出物と同じと考えられる⁸⁾。塩基性 7S グロブリンは山内らの方法²⁾で分離した。

オカラの調製

大豆を 3 倍量の水に浸漬膨潤させミキサーで 2 分間磨碎し (生呉)、これを沸騰させてから 8 分加熱した後、遠心濾過機 (4,500 rpm) でオカラと豆乳を分離した。このようにして調製したオカラを加熱オカラとして供試した。生オカラは、加熱オカラ同様に生呉を調製するが、未加熱のまま遠心濾過してオカラを分離した。

たん白質の定量

セミミクロケルダール法及びビュレット法によりたん白質を定量した。

電気泳動分析

鎌田ら⁹⁾の SDS-尿素系ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行った。

大豆たん白質消化酵素加水分解物の調製

大豆たん白質 (水抽出たん白質及び塩基性 7S グロブリン) にペプシン (豚粘膜由来, Merck 社製) 3% (w/w) を加え、pH 2, 37℃にて 20 時間酵素分解した。遠心分離した上澄みを加水分解液とした。

ACE 阻害ペプチドのスクリーニングと単離精製

加水分解液を Dowex 50W×4 (H 型) (4.5×20 cm) カラムにより脱塩した後、Sephadex G-25 カラム

(2.8×90 cm) でゲル濾過した。更に陽イオン交換体 SP Sephadex C-25 カラム (1.5×33 cm) に吸着させた後蒸留水から 3% NaCl のリニアグラジエント法により溶出し、ペプチドを分画した。これらのペプチドの中で ACE 阻害活性の強かったものを逆相分配系 HPLC カラム TSK-gel ODS-120T (7.5×250 mm) により精製しペプチドを単離した。

アミノ酸分析とアミノ酸配列の決定

アミノ酸分析は常法により酸加水分解後、ダブシル化アミノ酸として HPLC により分析した。アミノ酸配列は自動エドマン分解により気相プロテインシーケンサー (島津製作所製) を用いて決定した。

ACE 阻害活性の測定

基質として 250 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.3) に溶かした 3 mM Hippuryl-His-Leu (ペプチド研究所製) を用いて Cushman らの方法¹⁰⁾に準じて測定した。HPLC で分取した試料の活性は、減圧下で濃縮乾固して溶媒を完全に除去した後蒸留水に再溶解して測定した。なお、試料ペプチド間の活性の比較は IC₅₀ 値、すなわち ACE 活性に対する阻害率が 50% である時のペプチド濃度で表した。

結果と考察

オカラたん白質の種類と抽出挙動

生オカラの成分分析を行った結果を Table 1 に示した。生オカラには湿潤状態で 4.7%, 乾物にして 23-24 % のたん白質を含んでいた。濾布を通しただけのオカラには豆乳由来のたん白質がかなり残っていると予想されるので、水抽出による洗浄を行った。4 回繰り返したところ、オカラたん白質の 40-45% が抽出除去された。更に洗浄を重ねてもそれ以上は抽出されず、約半分のたん白質はオカラ中に残存した。水で抽出されずオカラに残ったたん白質の組成を電気泳動により分析する目的で 0.1% SDS と 8 M 尿素を含む緩衝液で抽出し SDS-PAGE により解析した (Fig. 1)。オカラの水抽出区分は殆ど大豆の全たん白質と同じ電気泳動図を

Table 1. Contents of okara component

Component	g/100 g Okara
Moisture	80.1
Protein	4.7
Oil	3.6
Ash	0.9
Carbohydrate	10.7

示した(Fig. 1 レーン 1, 2)。十分に水洗したオカラから抽出されたたん白質は Fig. 1のレーン 3, 4 に示すようにメルカプトエタノール (ME) が存在する還元状態では 26 kDa と 16 kDa の 2 本のバンドが現れ, ME 非存在下では 42 kDa の中間サブユニット 1 本になった。100℃加熱オカラと生オカラから抽出された成分を比べると, ME 存在下では同じパターンを示すが (Fig. 1 レーン 5), 非還元下では加熱オカラから 42 kDa バンドが消失 (レーン 6) した。このことはオカラたん白質が加熱により SS 結合を介して結合しオカラから抽出され難くなったことを示している。

電気泳動分析の結果から, オカラたん白質は 26 kDa と 16 kDa のポリペプチドが SS 結合でつながった 42 kDa のポリペプチド鎖を構成サブユニットとする, 単一たん白質から成ることが明らかになった。このた

ん白質は, その泳動位置が塩基性 7S グロブリンと一致した (レーン 7, 8) ことから, BG と結論した。

生オカラを材料にした塩基性 7S グロブリンの新たな調製法

先に報告した大豆種子から BG を単離精製する方法^{2,3)}は, 各種のクロマトを用いるため時間を要する方法であった。そこで本研究では Fig. 1の結果に基づいて, 生オカラから BG を分離する方法について検討することにした。十分に水洗した生オカラを材料にして以下の各種の溶媒で抽出し上澄液を得た。これを先に述べた電気泳動分析に供し, BG の溶出挙動を比較した (Fig. 2)。

①NaCl 溶液

オカラ中の BG の溶出挙動を NaCl 濃度を変えて検討した (Fig. 2-A)。0.2 M からほぼ単一の BG バン

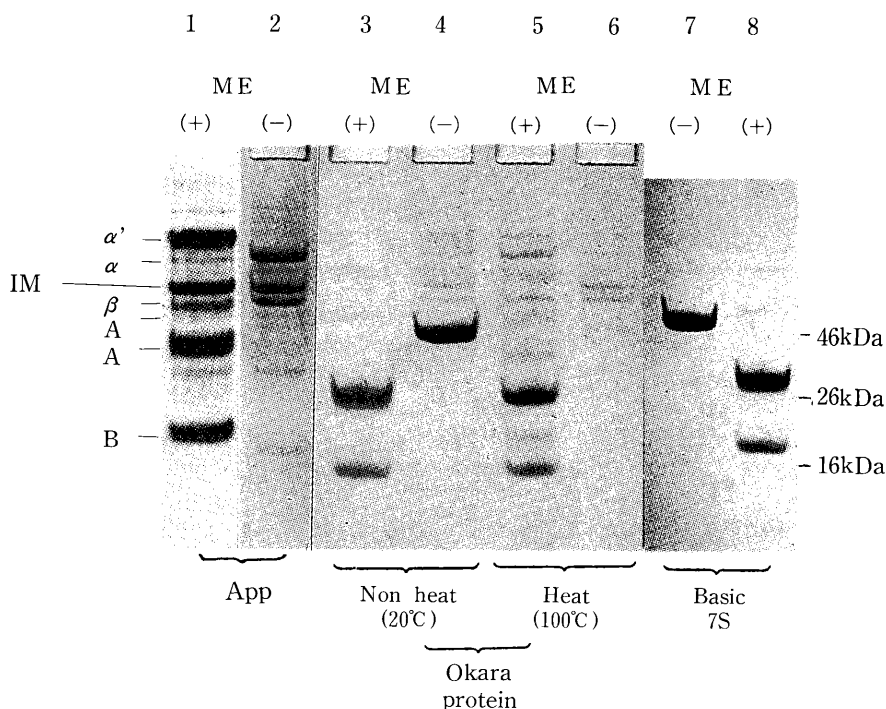


Fig. 1. SDS/urea PAGE analysis of protein components prepared from unheated and heat-treated okara.
lanes 1 and 2, soybean acid precipitated protein
lanes 3 and 4, protein fractions extracted from unheated okara
lanes 5 and 6, protein fractions extracted from heated okara
lanes 7 and 8, basic 7S globulin
ME, 2-mercaptoethanol
(-), without ME
(+), with ME

ドが検出され、0.3 M 以上ではバンドの濃度に差が見られなかった。従って、オカラから NaCl で抽出する場合は0.3 M 濃度が最適と分かった。

②尿素溶液

水素結合を主に切断すると言われる尿素有濃度を交えて、同様に BG の溶出挙動を検討した (Fig. 2-B)。その結果、尿素濃度 1 M 以上で BG が溶出されるのが観察されたが、更に尿素濃度を上げてバンドの濃度に変化が無かった。

③SDS 溶液

疎水結合を切断する SDS を抽出剤として用い BG の溶出挙動を検討した (Fig. 2-C)。SDS 濃度の増加に伴い BG バンドの濃度が増したが0.5%以上では一定になった。しかし0.4%以上になると BG 以外のたん白質も僅かに検出されるようになるので、オカラ中には BG 以外に疎水結合で結合しているたん白質が存在するものと推定される。

④pH の影響

抽出緩衝液の pH の影響について検討した (Fig. 2-D)。pH 6では殆どバンドが検出されず、pH 8でバンドが強く検出された。

以上の結果から、BG の新たな調製法としてオカラを材料に0.3 M NaCl で抽出する方法が最も簡便で有効であることを明らかに出来た。

大豆たん白質酵素分解物の分画と ACE 阻害活性の測定

大豆水抽出たん白質と塩基性 7S グロブリンのペプシン分解物を Dowex 50W による脱塩、ゲル濾過による分画の後、SP Sephadex C-25に吸着させた。NaCl グラジエントにより溶出したところ、水抽出たん白質では SP I と SPII の二つに、BGでは SP I, SPII, SPIII, SPIVの4つのペプチド群に分画できた。これらの各フラクションの ACE 阻害活性を測定したところ、水抽出たん白質では SP I の活性が強く IC 値は0.24 mg/mL で SPII の約5倍であった。BG は SPIII と SPIVの活性が強く、それぞれ IC 値は0.46 mg/mL, 0.51 mg/mL であった。

活性ペプチドの単離とアミノ酸配列

ACE 阻害活性の見られた水抽出たん白質由来 SP I と、塩基性 7S グロブリン由来 SPIII と SPIVを逆相分配 HPLC で分析したところ、各画分とも約50本以上のピークに分かれた (Fig. 3)。これらのペプチド群の中から活性ペプチドをスクリーニングするために、各ピークを分取して ACE 阻害活性を測定した。活性の強かったフラクション (Fig. 3の縦棒で示した部分) は再クロマトを行い、単一ピークになるまで繰り返した。

キャピラリー電気泳動で単一ピークになったものを単離ペプチドとした。これらのペプチドの ACE 阻害活性を測定し、活性の強かったものについてアミノ酸配列分析を行った。水抽出たん白質画分から4種のペプチドが、BG からは1種の活性ペプチドが同定された。Table 2にそれらのアミノ酸配列を示した。同時に行った、ペプチドの酸加水分解物のアミノ酸組成比の分析結果から、これらのアミノ酸配列が正しいことを確認した (Table 2)。

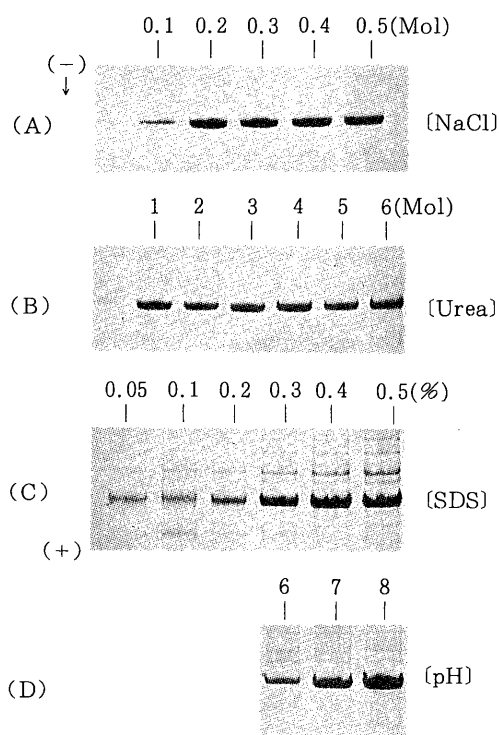


Fig. 2. SDS/urea PAGE patterns representing extraction behavior of okara protein with NaCl (A), urea (B), SDS (C), and pH (D).

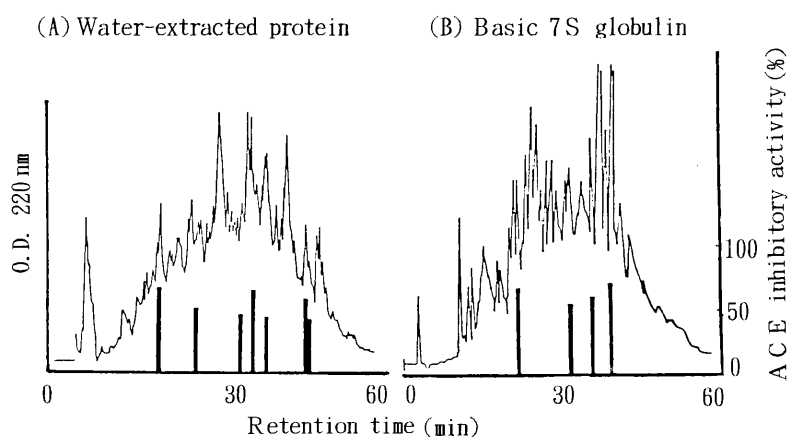


Fig. 3. Reversed phase HPLC patterns of soybean water-extracted protein (A) and basic 7S globulin hydrolysates (B), and screening of ACE inhibitor peptides.

Table 2. Analytical data for ACE inhibitor peptides

Amino acid sequence	Amino acid ratio in acid hydrolysate	IC ₅₀ (μ M)
Water-extracted protein		
Ile-Ala	Ile, 1.20; Ala, 1.00	53
Tyr-Leu-Ala-Gly-Asn-Gln	Tyr, 1.00; Leu, 0.81; Ala, 1.31; Gly, 1.26	14
Phe-Phe-Leu	Phe, 1.81; Leu, 1.00	37
Ile-Tyr-Leu-Leu	Ile, 1.00; Tyr, 0.73; Leu, 1.67	42
Basic 7S globulin		
Val-Met-Asp-Lys-Pro-Gln-Gly	Val, 1.00; Met, 0.82; Asp, 1.13; Lys, 0.83; Pro, 1.20; Gly, 0.98	39

文 献

- 1) 浅野三夫, 遠藤いずみ, 山内文男 (1993): オカラから検出された塩基性 7S グロブリンとその分離法. 日食工誌, **40**, 323-330.
- 2) Yamauchi F, Sato K and Yamagishi T (1984): Isolation and characterization of a salt-extractable globulin from soybean seeds. *Agric Biol Chem*, **48**, 645-650.
- 3) Sato K, Yamagishi T, Kamata Y and Yamauchi F (1987): Subunit structure and immunological properties of a basic 7S globulin from soybean seeds. *Phytochem*, **26**, 903-908.
- 4) Maruyama S, Nakagomi K, Tomizuka N and Suzuki H (1985): Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and ileum of rats. *Agric Biol Chem*, **49**, 1405-1409.
- 5) Maruyama S, Miyoshi S, Kaneko T and Tanaka H (1989): Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric Biol Chem*, **53**, 1077-1081.
- 6) 受田浩之, 松田秀喜, 箴島克裕, 松藤 寛, 松井利郎, 箴島 豊 (1992): 加熱イワン加水分解物中に存在するアンジオテンシン I 変換酵素阻害

- ペプチド. 農化, **66**, 25-29.
- 7) 河村幸雄 (1990): 食品たん白質由来の生理機能性ペプチド. 食品工業, **33**, 20-30.
- 8) Iwabuchi S and Yamauchi F (1987): Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean proteins by immunological methods. *J Agric Food Chem*, **35**, 200-205.
- 9) Kamata Y, Otsuka S, Sato M and Shibasaki K (1982): Limited proteolysis of soybean β -conglycinin. *Agric Biol Chem*, **46**, 2829-2834.
- 10) Cushman DE and Cheung HS (1971): Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol*, **20**, 1637-1648.