

屠畜場から生産される牛血液の有効利用に関する研究（平成6年度）

研究開発課 大庭 潔、岩下敦子、中山交市

1. 研究の目的と概要

わが国において、屠畜（牛、豚）の際に放血される総血液量は年間でおおよそ10万kgに達すると推定され、その大部分は、浄化処理後廃棄されている。

古来より日本では、魚の有効利用については多くの工夫がなされてきている。が、家畜由来の内臓や血液の有効利用についてはかなり立ち遅れた状態で現在に至っている。従って人体の健康維持増進に必要な成分が豊富に含まれている内臓や血液の価値を見直し、さらなる付加価値ある有効利用をはかろうとする気運が高まっている。

そこで、本研究では牛血液からグロビンたんぱく質の抽出方法の検討を行うとともに、得られたグロビンたんぱく質の諸性質の検討を行った。

2. 試験研究の方法

（1）グロビンたんぱく質の抽出

a：牛血液（株式会社十勝畜産公社より入手）を2倍量の0.9%NaClで3回洗浄を行い、得られた沈殿物を透析し、フリーズドライすることにより粗グロビンたんぱく質画分を得た。さらに、この粗グロビンたんぱく質画分をゲルろ過クロマトグラフィー（Sephacryl S-200: Pharmacia Biotech）に供し精製を行った。

b：牛血液をクロロフォルム、アセトン及びエタノール-エーテル混合液の3段階での洗浄を行い、沈殿物をフリーズドライすることによりグロビンたんぱく質画分を得た。

両方法によるグロビンたんぱく質の確認には分光光度計及びSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に共することにより行った。

（2）グロビンたんぱく質の溶解性及びゲル化性

a：pH依存におけるグロビンたんぱく質の溶解性

0.5%グロビンたんぱく質溶液をpH2～10の幅で10サンプル調整し、pH依存性におけるグロビンたんぱく質の可溶性を調べた。各pH区域における可溶性たんぱく質の定量はBio-Rad Protein Assay法を用いて行った。

b：加熱温度の違いによるグロビンたんぱく質の溶解性

pH4、pH5及びpH6の3領域における加熱温度の違い（50～100℃）に関してのグロビンたんぱく質の可溶性を調べた。各温度域での可溶性たんぱく質の定量はBio-Rad Protein Assay法を用いて行った。

c：グロビンたんぱく質溶液のゲル化性

1.0%グロビンたんぱく質溶液をpH4.5～6.5の幅で7サンプル調整し、90℃、15分間加熱をしB型粘度計によりゲル化性を調べた。

(3) アミノ酸組成分析

高速液体クロマトグラフィーを用いた NBD-F 法アミノ酸分析によりグロビンたんぱく質のアミノ酸組成を調べた。

3. 試験研究の結果

(1) グロビンたんぱく質の抽出方法による比較

グロビンたんぱく質をゲルろ過法及び有機溶剤による抽出法により得た。両方法におけるグロビンたんぱく質の回収率はそれぞれ総血液量に対して 0.8% と 1.7% であった。さらに、得られた両グロビンたんぱく質画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し同一のバンドとして確認した。両方法を比較してみると回収率、さらには色素の脱色度合いにおいて有機溶剤での抽出法において良い結果が得られた。

(2) グロビンたんぱく質の溶解性及びゲル化性

a : pH 依存におけるグロビンたんぱく質の溶解性

pH5 を越えるに従い徐々に溶解度は低くなり、さらに pH10 を越えると再び溶解度は上がる傾向にあった。

b : 加熱温度の違いによるグロビンたんぱく質の溶解性

加熱温度による溶解度の違いは現れなかった。従って、酸性 pH 領域でのグロビンたんぱく質の溶解性は加熱による影響を受けないことが示された。

c : グロビンたんぱく質のゲル化性

酸性 pH 領域での加熱によるグロビンたんぱく質のゲル化性が、pH5.5 前後という非常に狭い範囲において観察された。また、低濃度でこのような性質を示すことから、他の球状たんぱく質とは若干異なる性質を持っている。

(3) アミノ酸組成分析

グロビンたんぱく質のアミノ酸組成は栄養的な面からも非常に優れていると思われる。特に、必須アミノ酸の一つであるリジン含量が非常に高いという特徴が見られる。

4. 今後の課題

畜産副生物には様々な生理活性を持つ成分が存在しており、様々な分野で研究されてきている。もちろん血液に関しても様々な生理活性成分が注目されている。今後、ペプチドの生体調節機能に着目し、得られたグロビンたんぱく質を酵素処理することにより有用ペプチドのスクリーニングを行っていく予定である。

屠畜場から生産される牛血液の有効利用に関する研究（第2報）

（平成7年度）

研究開発課 大庭 潔、岩下敦子、永草 淳

1. 研究の目的と概要

十勝管内における食肉加工を目的とした屠畜はかなりの数にのぼるが、その血液はある特定の分野に利用されているにすぎない。そこで、昨年度よりさらなる付加価値ある有効利用を図ろうということで、牛血液からグロビンたん白質の抽出をはかるとともに、得られたグロビンたん白質の諸性質の検討を行った。

近年、食品の持つ生体調節機能を解明し、これを積極的に生体の健康維持増進に役立てようとする試みが盛んに行われている。特に、乳においては様々なたん白質において潜在的な生体調節機能因子が明らかにされ、このようなたん白質が持つ潜在的な機能を広く生物資源全般に求めることがなされている。

中でもアンジオテンシン 変換酵素阻害活性を有するペプチドは、これを食品として摂取することで高血圧予防に役立てようとする研究が注目を集めている。

本研究では、屠畜の際生産される血液中のグロビンたん白質に着目し、アンジオテンシン 変換酵素（ACE）阻害活性を有するペプチドを見出したので報告する。

2. 試験研究の方法

（1）グロビンたん白質の酵素分解

昨年度得られたグロビンたん白質 10g に 10 倍量の水を加え、2 分間ホモゲナイズし 98 ℃、15 分間煮沸し各種酵素の至適 pH、温度において 5 時間反応させた。反応終了後、遠心分離（10,000rpm、15 分間）を行い上清を得、98 ℃、15 分間処理することにより可溶性の加水分解液を得た。

加水分解に使用した酵素と条件は次の通りである。なお、酵素はたん白質量に対して 1.0% の添加を行った。

[使用酵素]

パパイン（ナガセ）	pH7.0	55
ニュートラーゼ（ノボ）	pH7.0	50
アルカラーゼ（ノボ）	pH8.0	55
プロテアーゼM（アマノ）	pH4.0	50

（2）ACE 阻害活性を有するペプチドの精製

酵素処理後の分解液を 30g の ODS 樹脂（ODS-AQ 120-S50、YMC 製）を充填したカラムに供し、250ml の水で洗浄し、その後それぞれ 250ml の 10%エタノール、25%エタノール及び 50%エタノールを順次通し、濃縮することにより、それぞれの画分（F-1、F-2、F-3）を得た。

次に、活性画分（25%EtOH 画分）をトヨーパール HW-40 カラムクロマトグラフィーによるゲルろ過を行い、活性画分を HPLC でさらに分離することにより、ACE 阻害ペプチドを得た。

使用した高速液体クロマトグラフィーは東ソー(株)製、カラムは TSK gel ODS-80T 及び TSK gel ODS-80T の 2 本連結で使用し、溶出は、0.1%トリフルオロ酢酸中アセトニトリル 14~42% (55分)のリニア・グラジエント及び0.1%トリフルオロ酢酸中アセトニトリル 45%で行った。

(3) ACE 阻害活性の測定

ACE 阻害活性は ACE (東京農業大学:ウサギ肺アセトンパウダーより抽出) 3.9mU、(株)ペプチド研究所合成基質 (Bz-Gly-His-Leu H₂O) 125mM を用いて、Cushman-Cheung の測定法に準じて測定した。すなわち、合成基質に ACE 活性が作用することにより、Bz-Gly (馬尿酸) と His-Leu が生成されることから、その中の馬尿酸を酢酸エチルにて抽出し、228nm の吸光度を測定した。

試料とともにあらかじめ反応停止液を加えたときの吸光度を A、試料の吸光度を B、試料の代わりに水を加えさらに反応停止液を加えたときの吸光度を C、試料の代わりに水を加えたときの吸光度を D として、

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (B - A) / (D - C)\} \times 100$$

で表した。試料間の ACE 阻害活性の比較は、上式により得られる阻害率が 50%を示す反応液中のたん白質濃度として IC₅₀ で示した。なお、たん白質量は Na₂SO₄-TNBS 法により測定した。

有機溶媒等に溶解している試料を使用する場合は減圧下で濃縮乾固して溶媒を完全に除去し測定した。

(4) ACE 阻害ペプチドの分子量の測定

ACE 阻害ペプチドの分子量の測定は HPLC により行った。標準ペプチドとして Neurtensin (分子量 1,672.9:シグマ社) Leupeptin (分子量 426.6:シグマ社) 及び Insulin (分子量 5,807:シグマ社) を用いた。

使用した高速液体クロマトグラフィーは東ソー(株)製、カラムは TSK gel G3000 PWXL を使用し、溶出は 0.1%トリフルオロ酢酸中アセトニトリル 45%で行った。

(5) ACE 阻害ペプチドのアミノ酸組成分析

塩酸加水分解後、HPLC を用いての NBD-F 法アミノ酸分析により行った。

3. 試験研究の結果

(1) グロビンたん白質の酵素分解

4 種のプロテアーゼによりグロビンたん白質の加水分解を行い、ACE 阻害活性を比較した。それによるとプロテアーゼ M による処理の場合が最も活性が高く、ニュートラーゼにおいては殆ど阻害活性が存在しなかった。

(2) ACE 阻害活性を有するペプチドの精製

プロテアーゼ M により処理したグロビンたん白質から ACE 阻害活性を有するペプチドを精製するために、最初に ODS 樹脂を充填したカラムに供し、阻害活性の最も高い F-2 の画分を得た。さらに、活性画分を濃縮乾固しトヨパール HW-40 によるゲルろ過を行った後、HPLC (TSK gel ODS-80T) によるさらなる分離を行った結果、7 種の阻害活性を有するピークを得ることができた (F-1、F-2、F-3、F-4、F-5、F-6 及び F-7)。得られたそれぞれの画分を分取し、各活性画分

を TSK gel ODS-80T の 2 本連結カラムを用いた HPLC により精製を行うことによりほぼ 7 種の画分を得ることができた。得られた画分におけるそれぞれの IC_{50} は 21.3 $\mu\text{g/ml}$ 、22.6 $\mu\text{g/ml}$ 、23.4 $\mu\text{g/ml}$ 、30.2 $\mu\text{g/ml}$ 、37.2 $\mu\text{g/ml}$ 、33.9 $\mu\text{g/ml}$ 及び 34 $\mu\text{g/ml}$ であった。

(3) ACE 阻害ペプチドの分子量の測定

先に得られた 7 種の ACE 阻害ペプチドの分子量を測定するために HPLC により行った。その結果、7 種とも分子量は 500 以下と推定された。また、得られたそれぞれの画分はどれもほとんど同一の分子量と推定された。

(4) ACE 阻害ペプチドのアミノ酸組成分析

得られた 7 種のペプチドを塩酸加水分解し、NBD-F 法アミノ酸分析により行った。その結果、F-1、F-2、F-3 及び F-4 画分においてはバリンが全アミノ酸のおよそ 70~90% を占めていた。また、F-5 画分においてはバリン、ロイシン及びグリシンが主要なアミノ酸であり、F-6 画分においてはバリン、グリシン及びロイシンが等モル含まれており次いでフェニルアラニン、セリン及びアスパラギン酸が等モル含まれていた。F-7 画分については構成アミノ酸が 4 種類と最も精製されており、主要構成アミノ酸はバリン、ロイシン、グリシン及びフェニルアラニンでありアミノ酸構成比はグリシン：ロイシン：フェニルアラニン：バリン = 1:1:1:2 となった。

4. まとめ

グロビンたん白質のプロテアーゼ分解物から ACE 阻害活性を有するペプチドを調整するために各種プロテアーゼの選択及びその精製方法について検討を行った。

(1) 分解に用いるプロテアーゼはプロテアーゼ M (アマノ) において最も高い活性が見出された (97.2%)。また、パパイン、アルカラゼにおいても 70% 前後の阻害を示した。ニュートラゼについては活性がほとんど見出せなかった。

(2) グロビンたん白質をプロテアーゼ M で処理後、ODS 充填カラム、トヨーパール HW-40 充填カラムを通した後 HPLC による分画を行った。その結果 7 種類の活性画分を得ることができた。

(3) 得られた 7 種類の画分はそれぞれほぼ同じ分子量を示したが、アミノ酸組成においては F-1、F-2、F-3 及び F-4 画分においてバリンが構成アミノ酸の大部分を占めていた。F-5、F-6、F-7 においてはロイシン及びフェニルアラニンの疎水性アミノ酸の割合が増加した。また、F-7 画分は構成アミノ酸が 4 種類であり最も精製が進んでいると推測される。なお、アミノ酸組成比はグリシン：ロイシン：フェニルアラニン：バリン = 1:1:1:2 となった。

F-1~F-7 画分においては、さらなる精製を行う必要があると考えられる。

(4) 今後、グロビンたん白質の精製を簡略化するために、酵素加水分解による家畜血液の脱色方法を用いることにより淡黄色の可溶性たん白質を集めることができる (ノボノルディスクバイオインダストリー株式会社よりの照会)。この方法により集められた可溶性たん白質画分に ACE 阻害活性が見出された (データには示していない)。このことからこれらの方法を利用してさらなる試験を行う必要があると考えられる。

屠畜場から生産される牛血液の有効利用に関する研究（第3報）

（平成8年度）

研究開発課 大庭 潔、永草 淳

1. 研究の目的と概要

本研究はと畜場から生産される牛血液の有効利用を図ることを目的に、血液中に含まれるグロビンタンパク質の付加価値向上に関して試験を行ってきた。これまでにグロビンタンパク質の抽出方法（有機溶剤を用いた方法）を検討すると同時に得られたグロビンタンパク質の酵素分解物中にアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性を有するペプチドを見出し報告した。

本報告ではこれまでに報告したグロビンタンパク質に含まれる生体調節機能性因子（ACE阻害活性）を生かした、グロビンタンパク質の血液中からの抽出方法に関して検討を行ったので報告する。

2. 試験研究の方法及び結果

（1）血液粉末

供試試料は十勝農業協同組合連合会畜産部化成事業課様より提供を受けた。これは脱脂後、熱風乾燥させたもので、粗タンパク質がおよそ90%を占めていた。

（2）グロビンタンパク質の抽出方法

血液粉末を水に懸濁させ粗タンパク質濃度として8~10%濃度とする。この懸濁液を1N NaOHでpH8.5に調整し、アルカラーゼ（ノボ社製）を1.5%添加し、50℃で5時間反応させる。その後、1N HClでpH4.0に調整することにより酵素を失活させる（pH調整後加熱することにより酵素の失活も可能）。さらにこの懸濁液を8,000rpm、15min遠心分離することにより上澄みを回収してくる。また、再度沈殿物を水で洗浄し遠心分離して上澄みを回収し先程の回収液と合わせ活性炭処理（ろ過）を行い、フリーズドライすることにより可溶性血液タンパク質（グロビンタンパク質）を得ることができた。

血液粉末から可溶性血液タンパク質（グロビンタンパク質）の回収率はおよそ70%であった。また、使用した酵素は昨年度行った試験で、グロビンタンパク質を加水分解した時最もACE阻害抑制を示した酵素を使用した。

（3）ACE阻害活性の測定

ACE阻害活性はCushman-Cheungの測定法に準じて測定した。具体的方法は平成7年度事業報告書に記載。

本試験で実施した抽出方法に従って得られた可溶性血液タンパク質（グロビンタンパク質）のACE阻害活性を測定した。その結果、 IC_{50} は13.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。これは様々な所で報告されているACE阻害活性を持っているペプチドに比較しても同等以上の活性を持っていた。また、昨年度報告したACE阻害活性と比較したところかなり精製が進んだ状態での活性と同等であった。これは、本抽出方法を取ることで純度の高いペプチドタンパク質が得られたものと考えられる。

また、分子量 10,000 での簡易分画を行い、Sephadex LH-20 による脱塩、さらに Sephadex C-25 によるゲルろ過を行い簡易精製工程を行った結果、その ACE 阻害活性は元の抽出可溶性血液タンパク質と同等の活性であった。

(4) 消化酵素処理試験 (ペプシン及びトリプシン処理)

本試験で得られた可溶性血液タンパク質は食品への利用を前提としている。従って食された場合胃及び小腸において分解され ACE 阻害活性が失活する可能性があることから市販消化酵素であるペプシン及びトリプシン処理を行った。

ペプシン (シグマ社製) 処理の場合には 0.1M HCl・KCl 緩衝液 (pH2.0) を、トリプシン (シグマ社製) 処理の場合には 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) を用いて先に得られた可溶性血液タンパク質 (グロビタンパク質) を溶解し、そのタンパク質濃度を 1.0% とした溶液 50ml に、同じ緩衝液に溶解した 0.2% 酵素液 5ml を加え、37 で 24 時間放置した。その後、沸騰水浴中で 5 分間加熱し、酵素を失活させ ACE 阻害活性を測定した。

その結果、ペプシン処理の場合の IC_{50} は 13.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トリプシン処理の場合の IC_{50} は 26.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。従って、本可溶性血液タンパク質は経口摂取された場合、消化過程においても ACE 阻害活性がかなり保持されるものと推定された。さらにオリゴペプチドが直接腸管から吸収されることは、大豆タンパク質、カゼインあるいは魚タンパク質などの部分加水分解物を用いて示されていることから、本血液タンパク質 (グロビタンパク質) についても同様に、ACE 阻害ペプチドの形で腸管内で吸収されている可能性がある。

3. まとめ

これまでの本試験研究 (平成 6 年度 ~ 平成 8 年度) を以下にまとめる。

- (1) 牛血液中に含まれるグロビタンパク質はアミノ酸組成的にみても非常に優れたタンパク質であり、その特性も各種食品への利用が幅広く可能であると考えられる。
- (2) これまでにグロビタンパク質の抽出法は有機溶剤を用いた抽出法が脱色及び回収率から見て優れていた。しかし、酵素法を用いることにより抽出方法が簡易となるばかりでなく回収率も向上する。また、得られた血液タンパク質にはかなり高い ACE 阻害活性が存在した。
- (3) 血液中に含まれるグロビタンパク質の酵素加水分解物にはアンジオテンシン変換酵素阻害活性を持つペプチドが数種含まれていた。従って、本年度実施した酵素法による抽出を用いることにより本生理活性を持ったペプチドが簡易に取得することが可能であった。
- (4) また、酵素法により得られた血液タンパク質 (グロビタンパク質) が食品として経口摂取した場合、消化過程においても ACE 阻害活性がかなり保持されていることが推測された。

4. 今後の課題

現在、北海道のと畜場におけると畜形態では、食品衛生法上その血液については食品への利用が禁止されている。しかし、諸外国 (特にヨーロッパ) においてはと畜の際に生ずる副生物は様々な食品に利用されている。従って、今後北海道においてもこれら潜在的に有用性がある副生物をと畜方法から見直し、有効利用できうように再検討をする必要があると考えられる。