

果汁添加加温スキムミルク分散液の凝固性および生成ペプチドの アンジオテンシン変換酵素阻害活性について[†]

Coagulation of Preheated Skim Milk Dispersion Induced by Various Fruit Juices and Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of the Resultant Peptides

星 祐二*
Yuji HOSHI

The clotting ability of fruit juices (fig, kiwi, mango, papaya, and pineapple) on skim milk dispersion preheated to 80°C was investigated. Mango and papaya did not clot milk, whereas fig, kiwi, and pineapple did. The curd obtained from kiwi juice showed the highest hardness, and scanning electron microscopic observation revealed that its microstructure was denser than that of curds derived from fig juice, pineapple juice, or rennet-treated milk. SDS-PAGE patterns of milk treated with mango and papaya were similar to those of intact skim milk. In contrast, κ -casein selectively disappeared in samples digested with fig and kiwi juice. Furthermore, almost complete degradation of all milk proteins was observed with pineapple. The ACE inhibitory activities (IC_{50}) of peptides prepared with kiwi and pineapple juice were 2.2 and 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, which were lower than that of peptides digested with trypsin (2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), indicating stronger inhibitory activity.

Key words: coagulation of milk, fruit juice, inhibitory activity of angiotensin-converting enzyme
ミルクの凝固、果汁、アンジオテンシン変換酵素阻害活性

1. 緒言

タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）は、植物や動物などの生体内に存在する身近な酵素で、ペプチドやタンパク質のペプチド結合を加水分解する。プロテアーゼは、栄養吸収、タンパク質の廃棄とリサイクル、生体防御など、幅広い生理的役割を担っている¹⁾。

プロテアーゼを含有している食材は多数存在し、例えば、キウイに含まれているアクチニジン²⁾は、食肉の筋原線維タンパク質をよく分解するので食肉を軟らかくすることなどに利用されている。一方、タンパク質分解酵素を含む果実類は、ゼラチンのタンパク質を分解し、凝固作用を弱めてしまうため、予め加熱して酵素を失活させてから使用することが推奨されている^{2,3)}。

ところで、香港では「姜汁撞奶」、広東では「薑撞牛奶」というデザートが薬膳専門店ではなく、一般的なレストランなどで食べられている。この料理は、ショウガ絞り汁に80°C前後に温め、砂糖で甘味をつけた牛乳を注ぎ込んでプリン状に固めたもので、店によっては、確実に凝固させるために卵白を加えるところもあるが、本来は、牛乳とショウガのみで作られるものである⁴⁻⁶⁾。日本でもインターネットなどを通じて一部の人々の間で話題になっており、この凝固作用はショウガに含まれるプロ

テアーゼ、「ジンジベイン」によるものとされている⁴⁾。ジンジベインは、分子量22,500、至適pH6.5~7.0、至適温度60°CのSH酵素であり、コラーゲンおよびミオシンを分解するため食肉の軟化にも利用されている^{3,7)}。

著者は、ジンジベインによる加温牛乳の凝固作用について、代表的な凝乳酵素であるレンネットによる凝固性と比較・検討した。その結果、カゼインの主要成分である α -カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼイン単独では、いずれもジンジベインの作用を受けるが、牛乳中では κ -カゼインが選択的に分解を受けることを明らかにした^{6,8)}。その原因として、著者らは、カゼインがミセル構造を形成することで、形式的にはレンネットと同様、カゼインミセル表面を覆う κ -カゼインが選択的に分解を受け、ミセルが不安定となって凝固するとした^{6,8)}。

一方、ショウガ以外のプロテアーゼ活性を有する食材でも、ショウガ同様、加温した牛乳に加えた際の凝固能の有無について関心がもたれたので、タンパク質分解酵素を含有するイチジク、キウイ、パイナップル、パパイヤ、およびマンゴー搾汁の牛乳凝固作用について検討することとした^{3,9,10)}。さらに、食品タンパク質のプロテアーゼ処理によって生成したペプチドには、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性を有するものもあるの

*宮城学院女子大学生生活科学部食品栄養学科

[†] 2025年10月22日受付、2025年12月9日受理

で¹¹⁻¹⁴⁾、果汁分解カゼインペプチドのACE阻害活性についても検討し、若干の知見が得られたので報告する。

II. 試料・試薬類および実験方法

1. 試料と試薬

1) 果実類

使用した果実類は以下の通りで、使用時に仙台市内の量販店から購入した。

- キウイ (ハイワード種) ニュージーランド産
- パイナップル (スモースカイン種) フィリピン産
- イチジク 熊本産
- パパイア フィリピン産
- マンゴー フィリピン産

なお、イチジク、パパイアおよびマンゴーについては一般的なものを購入し、産地は上記の通りであるが、品種については確認できなかった。

2) 牛乳試料

必要な時にすぐ調製できること、および再現性の観点からスキムミルクを牛乳試料とし、森永乳業製「CO・OP スキムミルク」を使用した。

3) 試薬類

α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、卵白アルブミン (OVA)、牛血清アルブミン (BSA)、カルボニックアンヒドラーゼ (CAH)、大豆トリプシンインヒビター (STI)、リゾチーム (LYS)、レンネット、および TPCK (*N*- α -トシル-L-フェニルアラニンクロロメチルケトン) 処理トリプシンは Sigma-Aldrich 製のものを用いた。カゼインナトリウム、およびその他の試薬類 (特級) は和光純薬工業 (現 富士フィルム和光純薬) から購入した。

4) 溶液類の調製

(1) 0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液

リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.192 g、およびリン酸水素二ナトリウム十二水和物 0.276 g を蒸留水に溶解し、pH 6.8 に調整後、100 mL に希釈した。

(2) 1.44 M トリクロロ酢酸

トリクロロ酢酸 23.5 g に蒸留水を加えて 100 mL とした。

(3) SDS 電気泳動用試料処理液および泳動用緩衝液

試料処理液は、0.5 M Tris (トリスヒドロキシメチルアミノメタン)-塩酸緩衝液 1.0 mL (pH 6.8)、蒸留水 7.0 mL、グリセロール 2.0 mL、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 0.1 g を混合して作成した。

泳動用緩衝液は、Tris 1.5 g、グリシン 7.2 g、SDS 0.5 g を蒸留水に加えて 400 mL としたものを用いた。

(4) 0.1% トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 溶液

亜硫酸ナトリウム 25 mg を蒸留水 20 mL に溶解したものと TNBS 20 mg を蒸留水 20 mL に溶解したものを混合し、0.1% TNBS 溶液を調製した。

(5) グリシン溶液 (10 μ g/mL)

グリシン 20 mg を蒸留水に溶解し、全量を 20 mL とした。そこから 0.5 mL を分取し、蒸留水で全量を 50 mL にし、10 μ g/mL のグリシン溶液を調製した。

2. 果汁およびスキムミルク分散液の調製

購入した果実の果肉を包丁で刻み、ミキサーにかけたものをガーゼで搾り、果汁を得た。その後、遠心分離 (3,000 回転、10 分間) を行い、得られた上清を実験に供した。20% スキムミルク分散液は、スキムミルク 20 g に蒸留水 80 mL を加えて調製した。

3. 果汁のスキムミルク分散液凝固能の確認

果汁 5 mL に、あらかじめ約 80°C に加温した 20% スキムミルク分散液 50 mL を加えて 30 分間放置し、凝固の有無を確認した。

4. 破断強度の測定

凝固能を有する果実の搾汁を 3,000 回転、10 分間の遠心分離を行って上清を得た。10 mL 容積のスチロール棒ビンに上記上清 1 mL を入れておき、あらかじめ約 80°C に加温した 20% スキムミルク分散液 10 mL を注ぎ込み、30 分間、室温で放置して凝固させた。得られたスキムミルク凝固物の破断強度は、スチロール棒ビンに凝固物が入ったままの状態、レオメーター (不動工業 NRM-2010J-CW) で圧縮し、圧縮荷重 (gf) の最大値を果汁凝固スキムミルクの破断強度とした。破断強度の測定は、200 gf のストレインゲージ、および直径 1 cm の平板型プランジャーを装着したレオメーターを用いて、圧縮速度 5 cm/min で行った。

5. プロテアーゼ活性測定

0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液に分散させた 1% カゼインナトリウム 3 mL に、果汁上清 0.3 mL を加え、37°C で 20 分間反応させた。反応後、終濃度 0.45 M となるように 1.44 M トリクロロ酢酸溶液 1.5 mL を加え、10 分間氷冷して反応を止めた。反応停止後、3,000 回転、10 分間遠心分離を行い、得られた上清の 280 nm における吸光度 ($A_{280 \text{ nm in } 20 \text{ min}}$) を測定し (Shimadzu UV-160)、この値を「プロテアーゼ活性」とした。また、単位タンパク質、および単位時間あたりの酵素活性である「比活性」を求めるために、Pierce Coomassie Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、果汁上清 0.3 mL に含まれるタンパク質量を測定した。測定は、製品の取扱説明書に従って行い、検量線はキットに付属の 0.2% BSA 溶液を、0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で所定の濃度に希釈して作成した。比活性は次式によって求めた。

比活性 ($A_{280\text{ nm}}/\mu\text{g}\cdot\text{min}$)

$$= \frac{\text{プロテアーゼ総活性} (A_{280\text{ nm in } 20\text{ min}})}{\text{反応時間} (20\text{ min}) \times \text{タンパク質量} (\mu\text{g})}$$

6. SDS 電気泳動

電気泳動は、既成ゲル (ATTO e-PAGEL ET-12.5L) を用いて行った。ガラスホモジナイザーを用いて、上記「3. 果汁のスキムミルク分散液凝固能の確認」と同様にして得た果汁添加凝固スキムミルクを均質化後、均質化試料 30 μL に試料処理液 1 mL を加えてから冷凍保存した。泳動前に解凍し、0.2% ブロムフェノールブルー (BPB) 液と 2-メルカプトエタノール (2-ME) をそれぞれ 40 μL と 10 μL を加えてから泳動に供した。SDS 電気泳動用の分子量マーカーとして BSA、OVA、CAH、STI、および LYS を使用した。

所定量の各試料液を泳動用ゲルに添加し、20 mA で 70 分間泳動した。泳動後のゲルは Comassie Brilliant Blue G-250 で 60 分間染色し、脱色は酢酸-メタノール水溶液を用いて行った。

7. Toyopearl HW-60 によるゲルろ過

1) ゲルろ過

果汁 1 mL に、あらかじめ 80°C 程度に加温した 10% スキムミルク (スキムミルク 10 g に蒸留水 90 mL を加えて調製) 10 mL を注ぎ、30 分間放置後、10% トリクロロ酢酸 11 mL を加えて酵素反応を停止させた。トリクロロ酢酸を加えてから 15 分間放置後、3,000 回転、20 分間の遠心分離を行って沈殿物を得た。得られた沈殿物を蒸留水で洗浄後、0.5% SDS を含む 0.02 M リン酸緩衝液 20 mL に分散させた。分散後、15,000 回転、20 分間の遠心分離にかけ上清を得た。得られた上清を Minisart (ポアサイズ 1.2 μm) で限外ろ過し、ろ液 2 mL に 0.4 mL のグリセロールを加えて混合後、Toyopearl HW-60 (カラムサイズ: 1.6 \times 52 cm) にかけて。溶出には、0.5% SDS を含む 0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液を用い (0.8 mL/min)、1 フラクションあたりの分取量を 4 mL とし、溶出液の 280 nm による吸光度を測定した (HITACHI U-5100)。

2) 溶出成分の SDS 電気泳動

上記ゲルろ過の溶出画分について、SDS 電気泳動を行った。ゲルろ過溶出液 0.5 mL に 0.2% BPB 溶液 20 μL と 2-ME 5 μL 、グリセロール 50 μL を加え、90°C で 10 分間加熱後、流水中で冷却したものを泳動用試料とした。用いたゲルや染色・脱色の方法は、「6. SDS 電気泳動」と同様に行った。

8. 走査型電子顕微鏡による果汁添加スキムミルク凝固物の微細構造観察

果汁を添加したスキムミルク凝固物、および対照としてのレンネット添加スキムミルク凝固物について、以下

のようにして観察用試料を調製した。

あらかじめ約 80°C に加温した 20% スキムミルク分散液 50 mL を、果汁上清 5 mL を入れておいたピーカーに注ぎ、30 分間放置して果汁添加スキムミルク凝固物を得た。

レンネット凝固物は、20% スキムミルク 50 mL に塩化カルシウム 15 mg を加え、40°C の湯浴中で保温しておき、1% レンネット水溶液 10 μL を加えて攪拌後、放置して得た。

上記凝固物から 1 辺が約 5 mm の立方体に切り出したものを走査型電子顕微鏡用試料とし、5% グルタルアルデヒド溶液中で暗所にて一晩放置し、固定化を行なった。一晩放置後、水洗してから 50、60、70、80、90、95、99% エタノールに順次 15 分間ずつ浸漬させて脱水を行なった。脱水後、50、70、100% *t*-ブタノールに順次 15 分間ずつ浸漬させエタノールの置換を行った後、凍結乾燥を行った (真空デバイス VFD-21S)。凍結乾燥試料に金蒸着処理を施してから (エイコー・エンジニア ION CORTER IB-3 型)、日立走査型電子顕微鏡 TM-1000 を用いて微細構造の観察を行なった。

9. 果汁添加スキムミルク分解ペプチドの ACE 阻害活性の測定

1) トリプシン添加スキムミルク分解ペプチドの調製

10% スキムミルク分散液 50 mL に TPCK 処理トリプシン 50 mg を加え、37°C で 1 時間反応させてから、0.5 M 塩酸を用いて pH を 4 に調整して反応を止めた。反応停止後、3,000 回転、10 分間の遠心分離を行って上清を回収し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて中和し、「トリプシン添加スキムミルク分解ペプチド」とした。

2) 果汁添加スキムミルク分解ペプチドの調製

あらかじめ 80°C に加温した 10% スキムミルク分散液 50 mL を、キウイまたはパイナップル搾汁 5 mL の入ったピーカーに勢いよく流し込み、そのまま室温で 30 分間放置して凝固させた。凝固後、3,000 回転、10 分間の遠心分離により上清を回収し、「果汁添加スキムミルク分解ペプチド」とした。

3) ペプチド濃度の測定

トリプシン添加または果汁添加スキムミルク分解ペプチド原液を適宜希釈後、希釈液 2 mL に 0.1% TNBS 溶液 1 mL を加えて、37°C で 1 時間放置後、420 nm における吸光度を測定し (HITACHI U-5100)、グリシンを標準物質として作成した検量線からペプチド濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求めた。

4) 果汁添加スキムミルク分解ペプチドの ACE 阻害活性測定

トリプシンおよび果汁添加スキムミルク分解ペプチドの ACE 阻害活性の測定は、同仁化学研究所の「ACE Kit-WST」を用い、付属の取扱説明書に従って以下のよ

うに行った。96穴マイクロプレートの各ウェルに、8連タイプマイクロピペッターでスキムミルク分解ペプチドを20 μL入れ、引き続き「Substrate buffer」を20 μL、「Enzyme working solution」20 μLを加えたものをS区（阻害剤濃度ごとに3本立て）とした。スキムミルク分解ペプチドの代わりに蒸留水20 μL、Substrate buffer 20 μL、Enzyme working solution 20 μLを加えたものをC区（3本立て）とした。さらに、Substrate bufferを20 μL、スキムミルク分解ペプチドとEnzyme working solutionの代わりに蒸留水40 μLを加えたものをB区（3本立て）とした。40°Cで60分間、保温庫でインキュベート後（ヤマト科学株式会社 Drying Oven DX602）、各ウェルに8連タイプマイクロピペッターで「Indicator working solution」を200 μLずつ加えた。室温で10分放置後、マイクロプレートリーダー（Thermo Scientific Multiskan FC）で450 nmの吸光度を測定し、以下の式を用いてスキムミルク分解ペプチドの阻害活性を求めた。

$$\text{ACE 阻害活性 (\%)} = \frac{C-S}{C-B} \times 100$$

B : B区の450 nmにおける吸光度

C : C区の450 nmにおける吸光度

S : S区の450 nmにおける吸光度

また、阻害率が50%となるペプチド濃度 IC₅₀ も求めた。

III. 結果

1. 各種果汁のスキムミルク凝固能

使用したイチジク、キウイ、マンゴー、パパイヤ、およびパイナップル搾汁の凝固能の有無を Table 1 に示す。イチジク、キウイおよびパイナップル搾汁にはスキムミルク分散液凝固能が認められた一方、マンゴーおよびパパイヤ搾汁は凝固能を示さなかった。

凝固物を食して見て、もっとも硬かった凝固物は、キウイ搾汁を加えたものであったが、離水も認められた。パイナップル搾汁を添加したものは、しっかりと凝固したが少量の離水も認められた。イチジク搾汁を加えたも

のは、凝固はしていたが、崩れやすかった。マンゴーやパパイヤ搾汁を添加したスキムミルクにはとろみはつくものの凝固にまでは至らなかった。

2. 破断強度

凝固能のある搾汁から得られた凝固物の破断強度を測定した結果を Table 1 に示す。表のように、キウイ搾汁添加凝固物の破断強度がもっとも高く、イチジクとパイナップルの破断強度はキウイ搾汁添加凝固物の30%程度であった。

3. 各種果汁のプロテアーゼ活性

各果実搾汁のプロテアーゼ活性を測定し、その結果を Table 1 に示す。総活性がもっとも高かったのがパイナップル、もっとも低かったのはパパイヤであり、凝固能を有する果実搾汁の総活性は高い傾向が認められた。一方、単位タンパク質量あたりのプロテアーゼ活性である比活性についても、パイナップル、イチジク、キウイの順であったが、キウイの比活性はマンゴーと同程度であった。

4. SDS 電気泳動

スキムミルクおよび果実搾汁添加スキムミルク分散液の SDS 電気泳動パターンを Fig. 1 に示す。未分解スキムミルクでは、カゼイン画分の α-カゼインと β-カゼインの

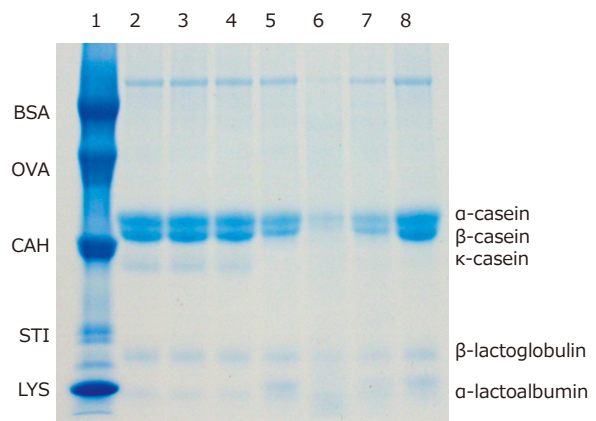


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of constituent proteins of skim milk digested with various fruit juices.

Electrophoresis was carried out using e-Pagel ET-12.5L (ATTO) at 20 mA for 70 min. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 for 1 hour and then destained using acetic acid-methanol-water solution.

lane 1: molecular weight standard proteins

lane 2: undigested skim milk

lane 3: skim milk treated with mango

lane 4: skim milk treated with papaya

lane 5: skim milk treated with kiwi

lane 6: skim milk treated with pineapple

lane 7: skim milk treated with fig

lane 8: skim milk treated with rennet

Table 1. Milk-clotting Abilities, Fracture Forces, and Protease Activities of Fruit Juices.

Fruit	Clotting Ability	Fracture force (gf)	Protease activity ($A_{280 \text{ nm}}$ in 20 min)	Specific protease activity ($A_{280 \text{ nm}} / \mu\text{g} \cdot \text{min}$)
Fig	Present	39.8	1.913	8.68×10^{-4}
Kiwi	Present	103.0	1.697	1.72×10^{-4}
Mango	Absent	—	0.913	1.45×10^{-4}
Papaya	Absent	—	0.843	1.06×10^{-4}
Pineapple	Present	34.6	9.117	3.27×10^{-3}

バンドが濃く染色されていた。写真では鮮明さに欠けている κ -カゼインのバンドに加えて、乳清画分の α -ラクトアルブミンと β -ラクトグロブリンも薄く染色されていた。

凝固能のない果汁を加えた場合は (レーン 3 と 4)、未分解スキムミルク (レーン 2) と同様、 α 、 β 、 κ -カゼインの主要バンドと乳清タンパク質画分が存在していた。一方、凝固能を有するキウイとイチジク (レーン 5 と 7) では、レーン 8 のレンネットと同様、 κ -カゼインのバンドが消失していた。プロテアーゼ活性がもっとも高かったパイナップル搾汁を添加した場合は、ほぼすべてのカ

ゼイン画分のバンドが消失していた (レーン 6)。

5. Toyopearl HW-60 によるゲルろ過

1) ゲルろ過パターン

果汁未添加のスキムミルクと凝固能のない果汁を添加したスキムミルクのゲルろ過溶出パターンを Fig. 2 に示す。未分解スキムミルクの溶出パターンでは、フラクションナンバー 10 付近のボイドボリュームとフラクションナンバー 13~15 付近に主ピークが溶出していた。凝固能のないパパイヤ搾汁添加スキムミルクの溶出パターンでは、未分解スキムミルクと同様、フラクション

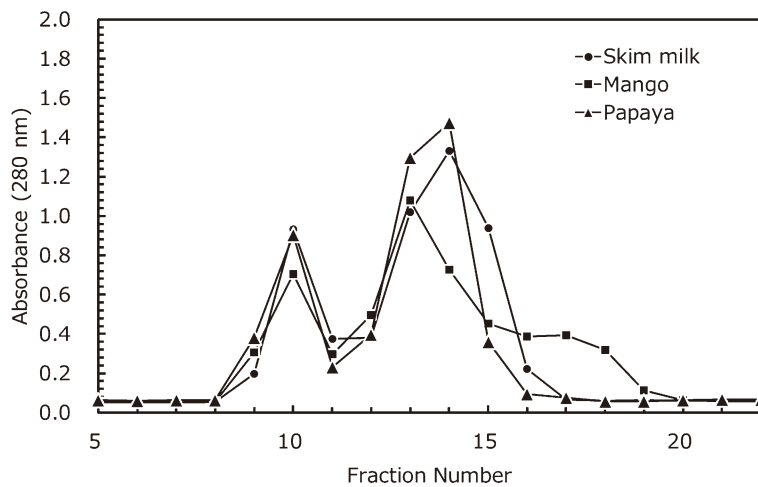


Fig. 2. Gel filtration profiles of skim milk treated with mango or papaya juice.

Gel filtration was carried out using Toyopearl HW-60 with a column size of 1.6×52 cm at flow rate of 0.8 mL/min. The effluent was collected in 4 mL fractions, and absorbance at 280 nm was measured.

Each sample was dissolved in 20 mL of 0.02 M phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.5% SDS, followed by centrifugation and ultrafiltration. Two milliliters of the resulting sample were mixed with 0.4 mL of glycerol and then applied to the column.

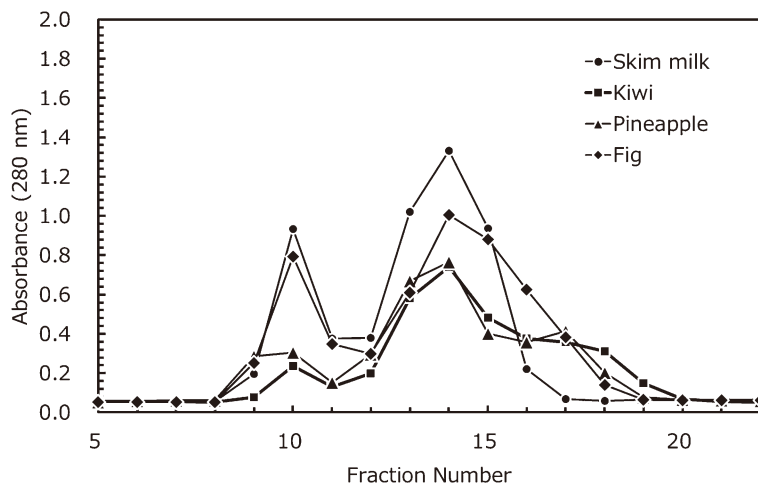


Fig. 3. Gel filtration profiles of skim milk clotted with kiwi, pineapple, or fig juices.

Each coagulum was dissolved in 20 mL of 0.02 M phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.5% SDS, and then homogenized using a glass homogenizer, followed by centrifugation and ultrafiltration. Two milliliters of the resulting supernatant were mixed with 0.4 mL of glycerol and applied to the column. Gel filtration was performed according to the method described in Fig. 2.

ナンバー 10 付近、およびフラクションナンバー 13~15 付近にピークが存在していた。マンゴー搾汁を加えた場合、フラクションナンバー 14~15 付近のピークの高さが減少し、逆にフラクションナンバー 16~18 付近にピークが出現していた。

凝固能を有する果汁を添加したスキムミルク凝固物の溶出パターンを Fig. 3 に示す。キウイおよびパインナップル搾汁を添加したスキムミルクの場合、未分解スキムミルクで確認されたボイドボリューム付近のピークが消失し、フラクションナンバー 13 から 15 の主ピークも減少する一方、フラクションナンバー 16~19 付近に溶出成分が出現するようになった。イチジク搾汁を加えた場合は、フラクションナンバー 13~15 付近のピークが低下し、フラクションナンバー 16~17 付近のピークが高くなる一方、ボイドボリューム付近にもピークは存在していた。

2) 溶出成分の SDS 電気泳動

果汁未添加および果汁添加スキムミルクゲルろ過溶出成分の SDS 電気泳動パターンを Fig. 4~9 に示す。いずれの写真とも左側のレーンから分子量マーカー、果汁未添加スキムミルク、果汁添加スキムミルク（ゲルろ過前）、ゲルろ過後の各溶出画分の泳動パターンである。なお、ここでも写真では、 κ -カゼインの染色性が低く、鮮明さに欠けていた。また、溶出液の 280 nm における吸光度から、電気泳動にかけるタンパク質量をなるべく揃えるように留意はしたが、果汁によってバンドの染色

性に差異が残った。

果汁未添加のスキムミルクでは、ボイドボリューム付近のピークに κ -カゼインと乳清画分の β -ラクトグロブリンのバンドが存在していた (Fig. 4 ; レーン 4、5)。一方、フラクションナンバー 15 付近の主ピークには α -カ

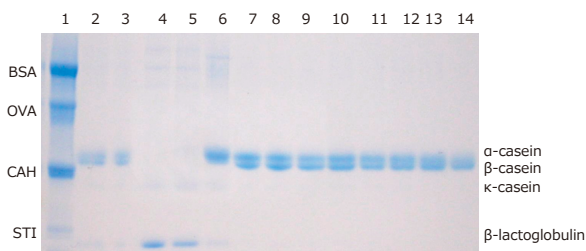


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of the column effluents (skim milk) shown in Fig. 2.

Electrophoresis, gel staining and destaining were performed as described in Fig. 1.

- lane 1: molecular weight standard proteins
- lane 2: skim milk
- lane 3: skim milk dispersion before gel filtration
- lane 4: fraction number 10
- lane 5: fraction number 11
- lane 6: fraction number 12
- lane 7: fraction number 13
- lane 8: fraction number 14
- lane 9: fraction number 15
- lane 10: fraction number 16
- lane 11: fraction number 17
- lane 12: fraction number 18
- lane 13: fraction number 19
- lane 14: fraction number 20



Fig. 5. SDS-PAGE patterns of the column effluents (papaya) shown in Fig. 2.

Electrophoresis, gel staining and destaining were performed as described in Fig. 1.

- lane 1: molecular weight standard proteins
- lane 2: skim milk dispersion before gel filtration
- lane 3: skim milk dispersion treated with papaya juice before gel filtration
- lane 4: fraction number 10
- lane 5: fraction number 11
- lane 6: fraction number 12
- lane 7: fraction number 13
- lane 8: fraction number 14
- lane 9: fraction number 15
- lane 10: fraction number 16
- lane 11: fraction number 17
- lane 12: fraction number 18

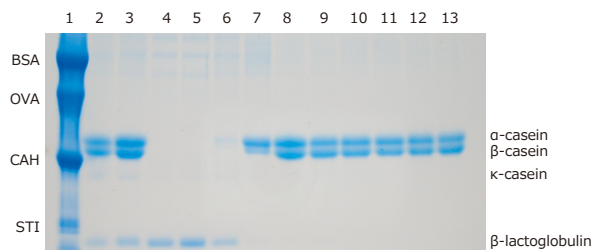


Fig. 6. SDS-PAGE patterns of the column effluents (mango) shown in Fig. 2.

Electrophoresis, gel staining and destaining were performed as described in Fig. 1.

- lane 1: molecular weight standard proteins
- lane 2: skim milk dispersion before gel filtration
- lane 3: skim milk dispersion treated with mango juice before gel filtration
- lane 4: fraction number 10
- lane 5: fraction number 11
- lane 6: fraction number 12
- lane 7: fraction number 13
- lane 8: fraction number 14
- lane 9: fraction number 15
- lane 10: fraction number 16
- lane 11: fraction number 17
- lane 12: fraction number 18
- lane 13: fraction number 19

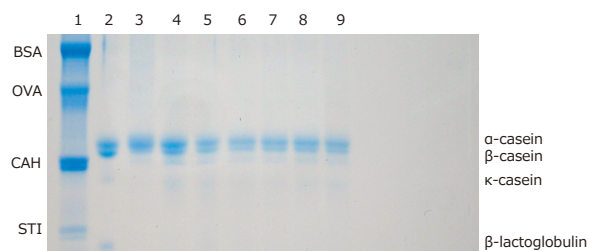


Fig. 7. SDS-PAGE patterns of the column effluents (kiwi) shown in Fig. 3.

Electrophoresis, gel staining and destaining were performed as described in Fig. 1.

- lane 1: molecular weight standard proteins
- lane 2: skim milk dispersion before gel filtration
- lane 3: skim milk dispersion treated with kiwi juice before gel filtration
- lane 4: fraction number 13
- lane 5: fraction number 14
- lane 6: fraction number 15
- lane 7: fraction number 16
- lane 8: fraction number 17
- lane 9: fraction number 18

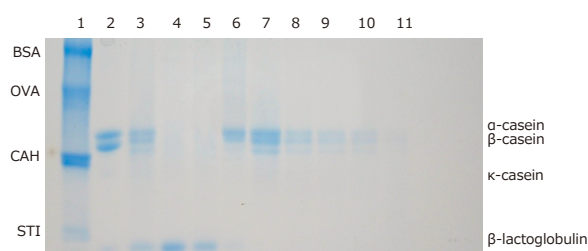


Fig. 9. SDS-PAGE patterns of the column effluents (fig) shown in Fig. 3.

Electrophoresis, gel staining and destaining were performed as described in Fig. 1.

- lane 1: molecular weight standard proteins
- lane 2: skim milk dispersion before gel filtration
- lane 3: skim milk dispersion treated with fig juice before gel filtration
- lane 4: fraction number 10
- lane 5: fraction number 11
- lane 6: fraction number 12
- lane 7: fraction number 13
- lane 8: fraction number 14
- lane 9: fraction number 15
- lane 10: fraction number 16
- lane 11: fraction number 17



Fig. 8. SDS-PAGE patterns of the column effluents (pineapple) shown in Fig. 3.

Electrophoresis, gel staining and destaining were performed as described in Fig. 1.

- lane 1: molecular weight standard proteins
- lane 2: skim milk dispersion before gel filtration
- lane 3: skim milk dispersion treated with pineapple juice before gel filtration
- lane 4: fraction number 9
- lane 5: fraction number 10
- lane 6: fraction number 11
- lane 7: fraction number 12
- lane 8: fraction number 13
- lane 9: fraction number 14
- lane 10: fraction number 15
- lane 11: fraction number 16
- lane 12: fraction number 17

ゼインと β -カゼインのバンドが存在していた。

凝固能のないパパイヤ搾汁を加えた場合は、ゲルろ過の各フラクションに溶出するカゼイン画分は、未分解スキムミルクと同様であった (Fig. 5)。また、マンゴー搾汁を加えた場合も、パパイヤ搾汁と同様の泳動パターンを示し、フラクションナンバー 19 (Fig. 6 ; レーン 13) でも α -カゼインと β -カゼインのバンドが存在していた。

凝固能を有する果汁を添加したスキムミルクをゲルろ過し、その溶出画分の SDS 電気泳動を行った結果を Fig. 7~9 に示す。キウイ搾汁を加えた場合は、ゲルろ過前の試料では κ -カゼインのバンドが消失しており (Fig. 7 ; レーン 3)、また、フラクションナンバー 13 以降には、 α または β -カゼインが分解されて生じたと思われるバンドが β -カゼインの直下に薄く染色されて存在していた (レーン 4~9)。プロテアーゼ活性がもっとも高かったパイナップル搾汁を加えた場合は、すべてのカゼイン画分のバンドが消失していた (Fig. 8)。一方、イチジク搾汁を加えたものは、ボイドボリューム付近には β -ラクトグロブリンのバンドが存在し (Fig. 9 ; レーン 4, 5)、フラクションナンバー 12~16 には α および β -カゼインとそれらが分解を受けたと思われるバンドが存在していた (レーン 6~10)。

6. 走査型電子顕微鏡による凝固物微細構造の観察

レンネットおよび果汁添加スキムミルク凝固物微細構造の走査型電子顕微鏡による観察結果を Fig. 10 に示す。比較のために作成したレンネット添加スキムミルク凝固物は、空洞の多い構造をしていた一方、果汁添加凝固物は、レンネット凝固物よりも緻密な組織を有することが確認でき、特にキウイでは均一で緻密な構造をしていることが確認できた。イチジクの微細構造はレンネット凝固物と類似していたが、レンネットよりも密な構造を呈していた。一方、パイナップルではキウイやイチジクと同様に緻密な構造をしている箇所に加え、凝固状態の異なる領域も認められた。

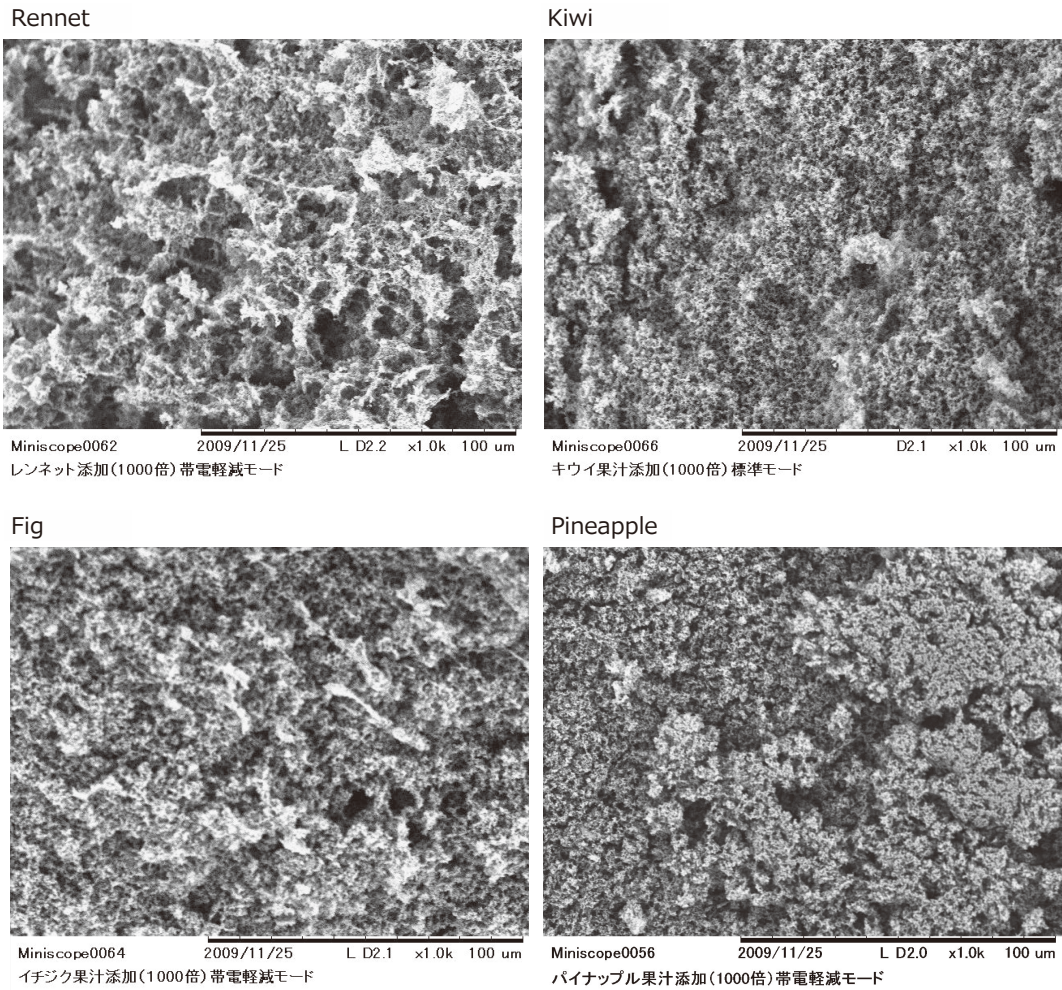


Fig. 10. Scanning electron micrographs of skim milk clotted with various fruit juices and rennet.

The coagulates were cut into cubes of approximately 5 mm per side and immersed in a 5 % glutaraldehyde solution. After overnight fixation, they were rinsed with water and then dehydrated by sequential immersion for 15 minutes each in 50, 60, 70, 80, 90, 95, and 99 % ethanol. Following dehydration, ethanol was replaced by sequential immersion for 15 minutes each in 50, 70, and 100 % t-butanol, after which freeze-drying was carried out. The freeze-dried specimens were coated with gold and observed for microstructure with a Hitachi scanning electron microscope (TM-1000).

7. 果汁添加スキムミルク分解ペプチドの ACE 阻害活性

TNBS 法によるグリシン濃度と 420 nm における吸光度との間に直線性があることを確認し (データ未掲載)、WST 法による果汁添加スキムミルク分解ペプチドの ACE 阻害活性を測定した。ACE 阻害活性におよぼす果汁添加スキムミルク分解ペプチドの濃度依存性の結果を Fig. 11 に示す。Fig. 11 から阻害活性が 50% となるのに必要なペプチド濃度 (IC₅₀) を求めた結果、キウイ搾汁添加牛乳分解ペプチドの IC₅₀ は 2.2 μg/mL、パイナップル添加では 1.6 μg/mL となり、スキムミルクをトリプシンで分解した場合は 2.9 μg/mL となった。

IV. 考察

イチジク、キウイ、マンゴー、パパイヤ、およびパイナップル搾汁に、あらかじめ約 80°C に加温したスキムミルク分散液に加えたところ、イチジク、キウイ、および

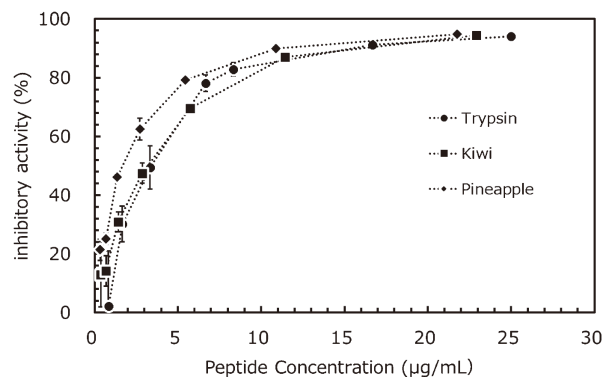


Fig. 11. Effects of peptide concentration derived from skim milk digested with fruit juices and rennet on angiotensin-converting enzyme inhibitory activity.

Inhibitory activity for angiotensin-converting enzyme was measured using ACE Kit-WST manufactured by Dojindo Laboratories according to its manual.

パイナップルに凝固能が認められた。レオメーターで測定した破断強度は、キウイ搾汁を加えて得られた凝固物よりも大きく、イチジクやパイナップル搾汁を加えたものの約3倍の破断強度を示し、凝固物を食した結果と一致した。パイナップル凝固物には少量の離水も認められ、また、イチジク搾汁添加物は、凝固はしたものの崩れやすかった。マンゴーやパパイヤ搾汁を加えた場合は、とろみはつくが凝固にまでは至らなかった。

ショウガのジンジベイン同様、イチジクのフィシン、キウイのアクチニジン、パイナップルのブロメラインはSH酵素であり⁷⁾、凝乳活性のあることは知られていた^{4,9,15,16)}。しかしながら、これらのプロテアーゼは凝乳と同時にペプチド結合も切断するので、この点が、トリプシンと同じように欠点とされてきた²⁾。今回、前報のショウガ搾汁のとき同様、あらかじめ80℃程度に加温したスキムミルク分散液を用いることにより、酵素が部分的に失活し、牛乳タンパク質の必要以上の分解を抑制したと考えられる⁸⁾。

凝固能のなかったマンゴーとパパイヤのプロテアーゼ活性は低値となり、一方、凝固能を有するイチジクとパイナップルは、マンゴーやパパイヤよりも高値を示した。キウイと凝固能のなかったマンゴーの比活性に大差はなかったが、プロテアーゼ総活性で比べれば、キウイの方が2倍弱の活性を示した。マンゴーやパパイヤのようにプロテアーゼ総活性と比活性がともに低いと凝固能を示さない一方 (Table 1)、イチジクやパイナップルは比活性が高すぎるため、凝固物の破断強度が低下したと考えられる。キウイのように総活性は比較的高く、比活性は高すぎないことが加温牛乳の凝固に適している可能性が示唆される。

スキムミルクおよび果汁添加スキムミルク分散液のSDS電気泳動パターンをFig. 1に示した。未分解スキムミルクでは、前報同様⁸⁾、カゼイン画分として α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼインが、乳清画分として β -ラクトグロブリンと α -ラクトアルブミンのバンドが存在していた。カゼイン画分に乳清タンパク質が共存したのは、スキムミルクが遠心分離によって乳脂肪のみを除去していること¹⁷⁾、および製造工程の殺菌処理により κ -カゼインと β -ラクトグロブリンがジスルフィド結合を介して複合体を形成するためと考えられている¹⁸⁾。

凝固能のない果実搾汁を加えた場合、未分解スキムミルクと同様、 α 、 β 、 κ -カゼインのバンドが存在していたが、凝固能を有するイチジクとキウイでは、レンネットを加えたときと同様、 κ -カゼインのバンドが消失していた。プロテアーゼ活性がもっとも高かったパイナップル搾汁を添加すると、ほぼすべてのカゼイン画分のバンドが消失しており、最適なプロテアーゼ活性のあることが、ここでも示唆される。

未分解スキムミルクを0.5%SDSで平衡化したゲルろ

過にかけると、カラムのボイドボリュームに相当するフラクションナンバー10付近と13~15付近に主ピークが存在し、Fig. 4に示したようにフラクションナンバー10付近には乳清タンパク質の β -ラクトグロブリンと κ -カゼインが、フラクションナンバー13~20には α -カゼインと β -カゼインが溶出していた。スキムミルクの製造工程で生成する κ -カゼインと β -ラクトグロブリンのジスルフィド性複合体は分子量が大きいため、カラムのボイドボリューム付近に溶出するが、電気泳動前に加えた2-MEによってジスルフィド結合が還元されるので、電気泳動では別個のバンドとして存在したと考えられる。

凝固能のないパパイヤ搾汁を加えた場合、フラクションナンバー16付近のピークが低下したが、ボイドボリュームやフラクションナンバー14付近の主ピークには変化は認められなかった。溶出成分のSDS電気泳動パターンも、Fig. 5に示したように未分解のスキムミルクと同様であった。マンゴー搾汁を加えた場合は、フラクションナンバー14~15付近のピークの高さが減少する一方、フラクションナンバー16~18付近にピークが出現したが、溶出成分のSDS電気泳動パターンは、未分解のスキムミルクやパパイヤ搾汁添加と同様の結果となった (Fig. 6)。

凝固能のあるキウイおよびパイナップル搾汁を添加したスキムミルクの場合、ボイドボリュームピークと主ピーク (フラクションナンバー13~15) が減少する一方、フラクションナンバー16~19付近に溶出成分が出現するようになった。イチジク搾汁を加えた場合は、主ピークがフラクションナンバー14~18付近にかけて溶出するようになる一方、ボイドボリューム付近にもピークは存在していた。凝固能を有する果汁のゲルろ過溶出成分についてSDS電気泳動を行ったところ、キウイでは、 κ -カゼインのバンドが消失するとともに、 α -カゼインや β -カゼイン由来と思われる分解バンドも染色されていた (Fig. 7)。パイナップル搾汁を添加した場合、Fig. 8に示したように、溶出画分にはカゼイン画分や乳清画分のタンパク質は存在しなかった。パイナップルのプロテアーゼ活性が高く、カゼインミセル表面を覆う κ -カゼインばかりでなく、ミセル内部の α -カゼインや β -カゼインも分解を受けたためと考えられる。また、凝固物を食してみると苦味が強く、苦味ペプチドが生成している可能性も示唆される²⁾。パイナップル搾汁添加の場合は、電気泳動的にはバンドは染色されなかったが、ゲルろ過の結果から、低分子量ペプチドまでには分解は進んでおらず、そのため凝固はしたものと示唆される。イチジク搾汁を加えた場合、ボイドボリュームには、未分解スキムミルクと異なり、 κ -カゼインのバンドはなく、 β -ラクトグロブリンのバンドのみが存在していた。また、フラクションナンバー12~16には α および β -カゼインとそれらが分解を受けたと思われるバンドが存在してい

たが (Fig. 9)、フラクションナンバー 14 以降のバンドの染色具合はキウイの場合よりも低く、イチジクはキウイとパイナップルの中間的な分解様式を示すものと考えられる。イチジク搾汁添加凝固物を食してみると苦味は感じられず、甘味が強く、もっとも食べやすかった。

果汁添加スキムミルク凝固物の微細構造を、走査型電子顕微鏡で観察した。レンネット添加スキムミルク凝固物は柔らかく、微細構造もそのゲル性状を反映しているものと考えられる。キウイ凝固物の微細構造は、レンネット凝固物よりも緻密な組織を呈しており、このため破断強度がもっとも大きかったものと考えられる。イチジクの微細構造はレンネット凝固物と類似していたが、レンネットよりも密な構造を呈していた。パイナップル凝固物には、キウイと同様の緻密な構造をしている部分と、それとは異なる凝固状態の部分が認められ、凝固状態の不均一性により破断強度が低かった可能性が考えられる。

WST 法を用いて、キウイおよびパイナップル搾汁を添加したスキムミルクから得られる分解ペプチドの IC_{50} を求めた。その結果、キウイ搾汁添加牛乳分解ペプチドの IC_{50} は $2.2 \mu\text{g/mL}$ 、パイナップル添加では $1.6 \mu\text{g/mL}$ 、常温で調製したスキムミルクにトリプシンを添加して得られたペプチドの場合は $2.9 \mu\text{g/mL}$ となり、キウイおよびパイナップル分解ペプチドの ACE 阻害活性は、トリプシン分解ペプチドよりも高いことが明らかとなった。Maruyama らはカゼインをトリプシンで分解することで、ACE 阻害活性を有する 2 種のペプチド、 CEI_5 (Phe-Phe-Val-Ala-Pro) と CEI_{97} (Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg) を分離し、 IC_{50} 値がそれぞれ $6.0 \mu\text{M}$ と $15 \mu\text{M}$ と報告している¹²⁾。これらを $\mu\text{g/mL}$ に換算すると、それぞれ $3.5 \mu\text{g/mL}$ と $12 \mu\text{g/mL}$ になり、今回得られたトリプシン分解ペプチドの IC_{50} は CEI_5 の阻害値に近いことが明らかとなった。

パイナップル搾汁はプロテアーゼ活性が高く、味を含めた加温スキムミルクの凝固性という観点からは必ずしも適してはいないが、ACE 阻害活性の点からは有効性が高いといえる。

V. 要約

80℃程度に加温した牛乳にショウガ搾汁を注ぐと牛乳を固められるが^{6,8)}、果汁 (イチジク、キウイ、マンゴー、パパイヤ、パイナップル) でも同様の現象が起きるのかを検討した。その結果、以下のようなことが明らかとなった。

1) 加温したスキムミルク分散液に果汁を加えた場合、凝固能が認められたのはイチジク、キウイおよびパイナップルで、キウイ搾汁を添加したものが体感的にもっとも硬く、破断強度値および走査型電子顕微鏡による微細構造の観察結果とも一致していた。

2) SDS 電気泳動を行った結果、マンゴーやパパイヤ搾汁を加えた場合は、未分解のスキムミルクと同様の泳動パターンを示した。イチジクとキウイ搾汁を加えた場合は、レンネット添加と同様、 κ -カゼインのバンドが消失していた。一方、パイナップル搾汁を添加した場合は、いずれのカゼイン画分とも、ほぼ分解を受けていた。プロテアーゼ比活性は、パイナップルが他の果汁より 1 桁高く、果汁を加えてスキムミルクを凝固させるには、適度なプロテアーゼ活性のあることが示唆された。

3) 果汁添加凝固物を SDS を含む緩衝液に溶解後、ゲルろ過にかけると、凝固能のないマンゴーおよびパパイヤ搾汁添加物の溶出パターンは未分解のスキムミルクとほぼ同様であった。一方、キウイおよびパイナップル搾汁添加物の溶出パターンは、ボイドボリューム付近のピークが消失し、主ピークも低くなった。イチジク搾汁を加えた場合は、ボイドボリューム付近のピークの高さは未分解のスキムミルクとほぼ同じで、主ピーク高もスキムミルクに比べれば低くなったが、キウイやパイナップル搾汁を加えたときよりは高かった。

4) キウイおよびパイナップル搾汁添加スキムミルク分解ペプチドの ACE 阻害活性は、いずれもトリプシン分解ペプチドよりも高く、特にパイナップル搾汁を加えた場合の IC_{50} がもっとも低く、 $1.6 \mu\text{g/mL}$ であった。

VI. 謝辞

本研究の実施にあたり、実験に協力いただいた本学芸学部食品栄養学科卒業生の齊藤成美氏、渡邊奈緒子氏、金澤多貴氏、佐藤明佳里氏、三升香南子氏、上村智子氏、高橋友里愛氏に感謝いたします。

VII. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

VIII. 引用文献

- 1) deMan M. J., Finley W. J., Hurst W. J. and Lee C. Y., (2018), *Principles of Food Chemistry*, Springer International Publishing AG
- 2) 西山一郎, 大田忠親, キウイフルーツ果汁のアクチニジン濃度およびプロテアーゼ活性の品種間差, 日本食品科学工学会誌, **49**, 401-408 (2002).
- 3) 久保田紀久枝, 森光健次郎, 「食品学—食品成分と機能性—」, 東京化学同人 (2021).
- 4) Nishimura K. and Goto M., Identification of the protease involved in and the effects of vitamin C on gel formation in ginger milk pudding (Jiang Zhi Xhaung Nai), *J. Home Econ. Jpn.*, **61**, 463-471 (2010).
- 5) 山本誠子, 奥村麻里, 大場智美, 為積沙奈絵, 松岡

- 博厚, 良質な乳カード形成に向けての生姜搾汁の牛乳凝固性についての研究, *日本調理科学会誌*, **42**, 309-314 (2009).
- 6) 星 祐二, ショウガ搾汁による牛乳の凝固について, 2009年度日本家政学会東北・北海道支部第54回研究発表会講演要旨
 - 7) Damodaran S. and Parkin K. L., (2017) *Fennema's Food Chemistry*, CRC Press.
 - 8) 星 祐二, 阿部 (相澤) 真美, 生姜搾汁による牛乳凝固機構の解析, 宮城学院女子大学生活環境科学研究報告, **56**, 1-11 (2024).
 - 9) 本橋 晃, 果汁に含まれるタンパク質分解酵素の作用をSDS-PAGEにより確認する, *生物教育*, **63**, 91-96 (2022).
 - 10) Sun Q., Zhang B., Yan Q.-J. and Jiang Z.-Q., Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources, *Food Chemistry*, **213**, 708-713 (2016).
 - 11) Maruyama S. and Suzuki H., A peptide inhibitor of angiotensin I converting Enzyme in the tryptic hydrolysate of casein, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1393-1394 (1982).
 - 12) Maruyama S., Nakagomi K., Tomizuka N. and Suzuki H., Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1405-1409 (1985).
 - 13) Terashima M., Baba T., Ikemoto N., Katayama M., Morimoto T. and Matsumura S., Novel angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from bonless chicken leg meat, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 7432-7436 (2010).
 - 14) Terashima M., Oe M., Ogura K. and Matsumura S., Inhibition strength of short peptides derived from an ACE inhibitory peptide, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 11234-11237 (2011).
 - 15) Kartwiria I. S., Elvina B. and Gunawan-Puteri M. D. P. T., Milk curd properties attributed to the application of a pineapple juice as a coagulant in cheese production, *J. Chemical Technology and Metallurgy*, **54**, 695-701 (2019).
 - 16) Afsharnejhad M., Shahangian S. S. and Sariri R., A novel milk-clotting cysteine protease from *Ficus johannis*: purification and characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, **121**, 173-182 (2019).
 - 17) "Milk Powder Production" https://www.rotronic.com/media/news/files/1466670855_FF-Milk-Powder.pdf (参照 2023-09-06)
 - 18) Sultan M., Katsuno N. and Nishizu T., Role of whey protein-casein complexes on yoghurt texture. *Reviews in Agricultural Sci.*, **5**, 1-12 (2017).