

研究ノート

小豆煮汁由来タンパク質分解酵素阻害成分の水産加工品への活用

近藤徹弥^{*1}、日渡美世^{*1}、石原那美^{*1}、山本晃司^{*2}

Utilization of Protease Inhibitor in Hot Water Extract of Adzuki Beans to Processed Marine Products

Tetsuya KONDO^{*1}, Miyo HIWATASHI^{*1}, Nami ISHIHARA^{*1} and Koji YAMAMOTO^{*2}Food Research Center^{*1*2}

小豆を煮熟する過程で発生する煮汁からトリプシン阻害物質を粗精製した。本物質は 121℃、15 分間の加熱処理によっても約 60%の阻害活性を維持しており、3.5%迄の食塩存在下では約 80%の阻害活性を示した。本物質はイトヨリダイのプロテアーゼも阻害した。さらに、イトヨリダイ練り製品の物性改良に有効であった。

1. はじめに

トリプシン阻害物質 (trypsin inhibitor, TI) は、小豆や大豆等に含まれており、消化不良を引き起こす抗栄養素とされてきた。しかし近年、インスリンの分泌促進や急性膵炎に対する治療効果等が認められ、健康機能性因子として注目されている。また、畜肉・水産加工品の物性改良への利用も行われている。

蒲鉾等の魚肉練り製品の独特の弾力は、製品の品質を左右する最も重要な要素である。この弾力は、塩摺りしたすり身を放置 (坐り) 後に 90℃前後で加熱することによって得られる。弾力の良し悪しは、坐り時の環境温度や時間、加熱中の温度履歴に大きく依存する。長時間の坐りや 50~60℃付近での緩慢な加熱は、弾力を著しく低下 (戻り) させて品質を落とす。この戻りの原因の一つが、魚肉中のプロテアーゼである。このため、大豆や卵白由来の TI をすり身に添加してプロテアーゼの活性を抑制し、物性の改良 (弾力の低下抑制や増強) が図られている。

我々は、製餡工程において大量に発生し、大部分は利用されずに廃棄されている小豆煮汁¹⁾にトリプシン阻害活性のあることを見出した。そこで本研究では、小豆煮汁中の TI を水産加工品の物性改良に活用することを試みた。

2. 実験方法

2.1 小豆煮汁の調製

北海道産の普通小豆「きたろまん」1kg を 3L の精製水に浸漬し、中火にかけた。沸騰後、精製水を 0.8L 加

えた。再度沸騰後、精製水を 0.8L 加え、再び沸騰させた後、小豆をザルに上げ、水洗した。水切り後、再び 3L の精製水を加えて強火で沸騰させ、その後弱火で緩やかに煮た。小豆が柔らかくなった後、ザルに上げた。残った煮汁を遠心分離し、その上清を水で 2.5L に定容したものを煮上水とした。

2.2 小豆煮汁からのトリプシン阻害物質の粗精製

煮上水の凍結乾燥物から、0.1%重曹による抽出、ポリビニルピロリドン (PVPP) 接触、硫酸アンモニウム分画、80%エタノール沈殿を経て、TI の粗精製を行った。各工程におけるトリプシン阻害活性は、トリプシン (豚膵臓由来) による benzoyl-D, L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) 加水分解反応に対する阻害活性により測定した (BAPNA 法)。BAPNA 法において、トリプシン 1μg の活性を 50%阻害 (阻害率 50%) するときの阻害活性を 1 trypsin inhibition unit (TIU) と定義した。

2.3 魚肉ゲルの調製と物性測定

イトヨリダイの魚肉ゲルは次のように調製した。200g のすり身に粗精製物 (cTI) の水溶液 (乾物として 0.8g、対照として水) 20mL を添加混合後、5g の食塩を添加してよく摺り混ぜ、直径 25mm のケーシングチューブに充填し、一次加熱を 30 分間、続いて二次加熱を 90℃で 20 分間行った。一次加熱の温度条件として、40℃で加熱したものを坐りゲル、60℃で加熱したものを戻りゲルとした。

各ゲルは 2cm 幅で円柱状に切断した。物性測定には直径 5mm の球形プランジャーを装着したクリープメータ

*1 食品工業技術センター 分析加工技術室 *2 食品工業技術センター 分析加工技術室 (現発酵バイオ技術室)

(山電製、RE2-33005c)を用いた。円柱の中心部にプランジャーが当たるようにゲルの位置を調整した後、1mm/sで圧縮試験を行い、破断強度と圧縮距離(凹み)を測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 小豆煮汁からのトリプシン阻害物質の単離・精製

TI の粗精製の結果を表 1 に示す。cTI の比活性は 31.4TIU/mg となり、精製度は約 8 倍上昇した。また、cTI は分子量 3500 以上で、水に可溶であったが、80% エタノールに不溶であり、ポリフェノール特異的吸着剤である PVPP にあまり吸着されなかった。cTI の性質及び IR スペクトルの結果から、cTI はタンパク質成分であると考えられた。

表 1 小豆煮汁からの TI の粗精製

	比活性 (TIU/mg)	全活性 ($\times 10^3$ TIU)	乾燥重量 (g)	精製度	収率 (%)
煮上水 (2L)	4.2	158.4	30.1	1	100
0.1%重曹上清	-	168.8	-	-	107
PVPP上清	-	150.2	-	-	95
硫酸沈殿-透析	24.7	153.4	5.0	6	97
エタノール沈殿	31.4	144.3	3.7	8	91

3.2 小豆煮汁由来 cTI の特性解析

魚肉練り製品は、2~3%の食塩を添加して魚肉を塩摺り後、加熱してゲル化させる。そこで加熱や食塩濃度が cTI の活性に及ぼす影響について検討した。

cTI 水溶液を各温度条件で加熱後、トリプシン阻害活性を測定した。cTI は煮熟工程を経ているため熱に安定であると予想されたが、cTI の耐熱性の高いことが改めて確認された(図1)。処理温度の上昇に伴い、cTI のトリプシン阻害率はやや低下したが、オートクレーブ処理後も対照の約 60%の活性が維持されていた。

また、1.5%~3.5%の食塩存在下における cTI のトリプシン阻害活性は、食塩無添加時の約 80%にまで低下した(結果は図示せず)。

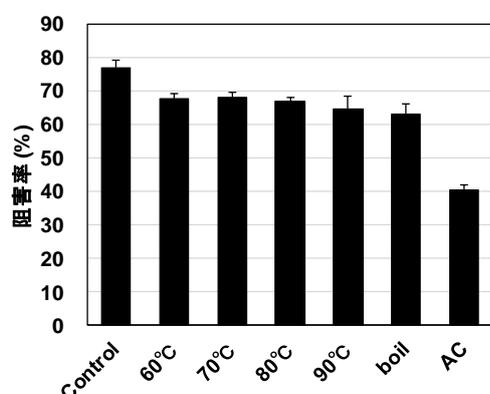


図 1 粗精製トリプシン阻害物質の熱安定性
Control:未加熱; 60°C~boil: 30分間加熱; AC: オートクレーブ 121°Cで 15分間加熱。測定は n=3 で行った。

3.3 cTI による水産加工品の物性改良効果

イトヨリダイには、50~60°Cで戻り現象を誘発する複数のセリンプロテアーゼが存在する²⁾。イトヨリダイのフィレーから調製したプロテアーゼ抽出液に対して、カゼインを基質として 60°Cにおけるプロテアーゼ活性を測定したところ、cTI はイトヨリダイのプロテアーゼを阻害した。

戻りゲル及び坐りゲルについて、SDS-PAGE 解析及び SEM 観察を行ったが、cTI 添加による明確な差異は認められなかった。しかし、クリープメーターを用いて物性を測定したところ、対照区に対して cTI 添加区では坐りゲル、戻りゲルともに破断強度が有意 ($p < 0.05$) に増加した(図2A)。圧縮距離は、坐りゲルでは有意差は認められなかったが、戻りゲルでは cTI 添加によって有意 ($p < 0.05$) に増加した(図2B)。試食の結果、cTI 添加区の坐りゲル、戻りゲルは対照区に比べて弾力があり、プリプリとした食感を有していた。

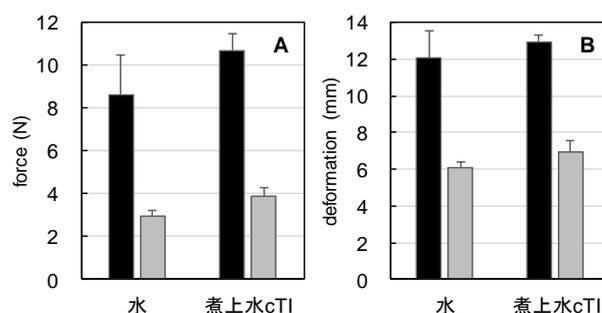


図 2 魚肉ゲルの破断強度 (A)、及び圧縮距離 (B)
■:坐りゲル、■: 戻りゲル。測定は n=6 で行った。

4. 結び

本研究において、小豆煮汁由来 cTI がイトヨリダイ練り製品の物性改良に有効であることが明らかになった。大豆や卵白由来 TI の利用にはアレルギーに対する配慮が必要である。しかし、小豆アレルギーは希少であるため、食物アレルギー対策の点から、小豆煮汁は大豆や卵由来成分の代替えとして有効であると考えられた。

付記

本研究は、(公財)日本豆類協会平成 26 年度豆類振興事業助成金を受けて実施した。

文献

- 1) 鈴木繁男監修: 餡ハンドブック, (1975), 光琳書院
- 2) M. Kinoshita, H. Toyohara, Y. Shimizu, M. Sakaguchi : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 715(1992)