

平成 26 年度豆類振興事業調査研究(雑豆需要促進研究)成果概要

- 1 課題名 小豆加工廃液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
- 2 研究者 あいち産業科学技術総合センター 食品工業技術センター 分析加工技術室
主任研究員 近藤徹弥、主任研究員 日渡美世、技師 石原那美
あいち産業科学技術総合センター 共同研究支援部 計測分析室 主任 船越吾郎

3 成果概要

(1) 背景と目的

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、プロテアーゼの活性を抑制して物性の改良(弾力の低下抑制や増強)を図るため、大豆や卵白由来の TI をすり身に添加することが行われている。

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にトリプシン阻害活性が残存していることを見出した。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) 試験項目

①小豆煮汁からのトリプシン阻害物質の単離・精製

小豆煮汁からトリプシン阻害物質を精製する方法について検討した。

②小豆煮汁由来トリプシン阻害物質の特性解析

トリプシン阻害物質の水産加工品への活用を念頭に、阻害活性に及ぼす加熱や食塩濃度の影響について検討した。

③トリプシン阻害物質による水産加工品の物性改良効果の評価

粗精製トリプシン阻害物質の魚肉プロテアーゼに対する阻害効果を評価した。粗精製トリプシン阻害物質を添加して試作した魚肉練り製品の物性を評価した。

(3) 結果及び考察

①小豆煮汁からのトリプシン阻害物質の単離・精製

煮汁の調製は以下のように行った。北海道産の普通小豆(きたろまん)1 kg を 3 L の精製水に浸漬し、中火にかけた。沸騰後、精製水を 0.8 L 加えた。再度沸騰後、精製水を 0.8 L 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 3 L 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。

煮上水の凍結乾燥物から、**図 1** の精製手順に従い、TI の精製を行った。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 1 μ g 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。

TI の粗精製の結果を表 1 に示す。粗精製物 (cTI)の比活性は 31.4 TIU/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ポリビニルポリピロリドン (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。

②小豆煮汁由来トリプシン阻害物質の特性解析

魚肉練り製品では、通常 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 2)。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)。

③トリプシン阻害物質による水産加工品の物性改良効果の評価

魚肉練り製品の原材料としてよく使用されるイトヨリダイを対象に、魚肉プロテアーゼ活性に及ぼす cTI の影響について検討した。イトヨリダイには、50~60 $^{\circ}$ 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。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の 60 $^{\circ}$ 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。

次に、イトヨリダイの魚肉ゲルを以下のように調製して、物性を評価した。200g のすり身に 20mL の cTI 水溶液 (乾物として 0.8g、対照として水)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 $^{\circ}$ Cで 30 分間加熱した。一次加熱の温度条件として、40 $^{\circ}$ Cで加熱したものを坐りゲル、60 $^{\circ}$ Cで加熱したものを戻りゲルとした。調製した魚肉ゲルの写真を図 3 に示す。対照の魚肉ゲルが白色であるのに対し、cTI 添加区はわずかに赤茶色を呈した。

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 (山電製、RE2-33005c)を用いた。ゲルを 2cm 幅で円柱状に切断したものを試験片として、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。

その結果、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 4A)。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 4B)。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。

(4) 今後の展望

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。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。小豆アレルギーは希少であるので、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。さらに、本研究を発展させ、製餡企業や水産加工企業との連携を図り、実用化を進めたい。

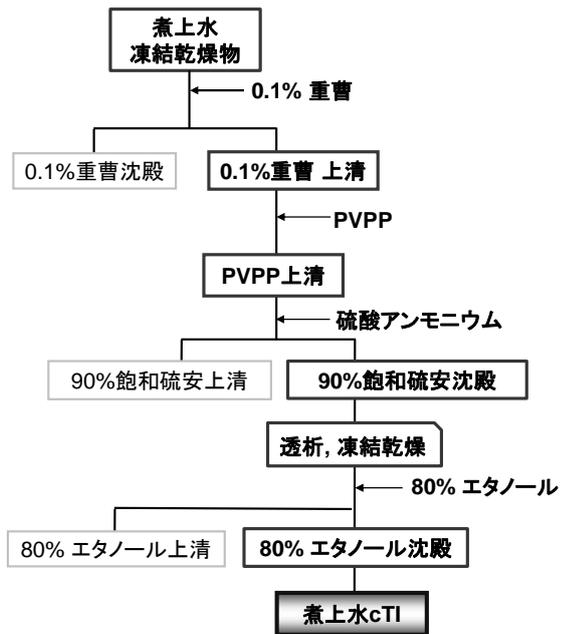


図 1 小豆煮汁からのトリプシン阻害物質の粗精製の手順

表1 小豆煮汁からの TI の粗精製

	比活性 (TIU/mg)	全活性 (x10 ³ TIU)	乾燥重量 (g)	精製度	収率 (%)
煮上水 (2 L)	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	6	97
エタノール沈殿	31.4	144.3	3.7	8	91

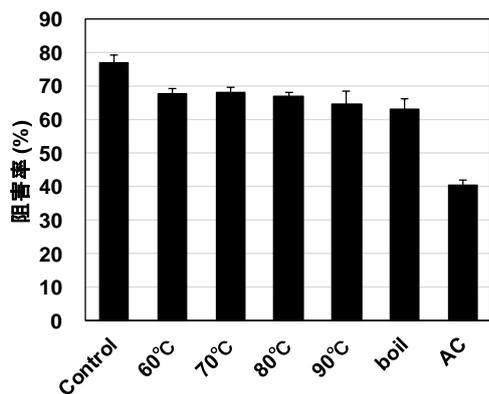


図 2 粗精製トリプシン阻害物質の熱安定性
Control: 未加熱; 60°C~boil: 30 分間加熱;
AC: オートクレーブ 121°Cで 15 分間加熱。
測定は n=3 で行った。

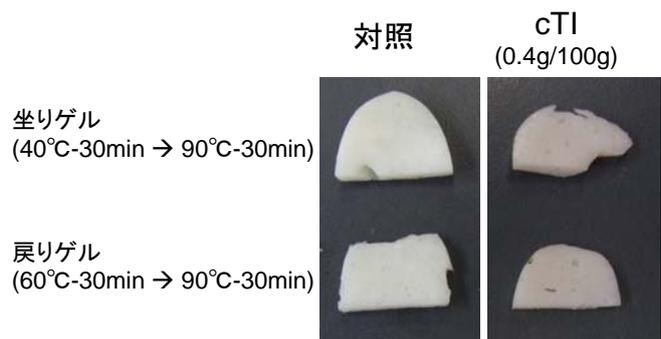


図 3 魚肉ゲルの写真

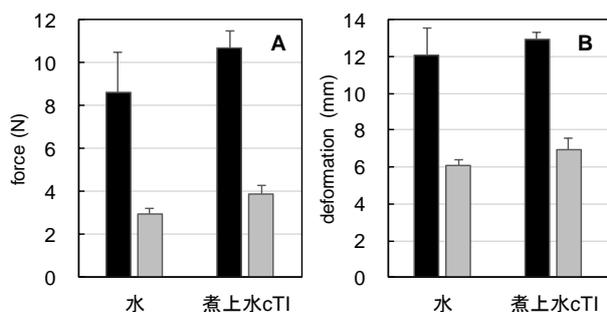


図 4 魚肉ゲルの破断強度 (A)、及び圧縮距離 (B)
■:坐りゲル、■: 戻りゲル。測定は n=6 で行った。