

市販酵素製剤によるマイワシ圧力酵素分解の促進

重田有仁, 青山康司, 岡崎 尚, 松井利郎*, 難波憲二**

Acceleration of Proteolysis under Pressurization of Sardine by Protease Preparation

Yujin SHIGETA, Yasushi AOYAMA, Takashi OKAZAKI, Toshiro MATSUI * and Kenji NAMBA **

To shorten the autolytic period of fish, the additional effect of commercially available proteinase preparation was examined in autolytic hydrolysis under pressurization (AHUP) of sardines. Among the 7 neutral proteinase preparations tested, we selected Orientase ONS. Nitrogen recovery (%) was extremely improved by addition of the Orientase ONS. The enzymolysis period of AHUP of sardines could be shortened to 24 hours by adding the Orientase ONS at 0.5% to sardines.

これまで著者らは、圧力を利用することにより食塩を添加することなく短時間に水産魚介類の魚醤油様の分解エキスを製造する圧力酵素分解技術について検討してきた¹⁾。本技術では、原料に圧力を負荷することによって製造期間中の微生物の発育を抑制し、同時に原料の持つ自己消化酵素の最適温度で分解させることにより製造時間の短縮化を図る。カタクチイワシを原料として用いた場合、分解条件を60MPa, 50℃, 24時間とすることにより高濃度のエキス(全窒素2.58%, ホルモール窒素1.13%)を短時間に得ることができた。

本技術の実用化において、原料の選択は重要な課題である。カタクチイワシは分解性に優れており、得られたエキスの呈味性も良好であったが、近年、漁獲高の減少から価格が高騰しており、エキス原料として用いるにはコスト的に問題がある。そこで、比較的安価なマイワシを原料として利用することとした。しかし、予備試験を行った結果、マイワシの場合、24時間では十分に分解することはできなかった。

加圧加熱処理装置は比較的高価な装置であるため、分

解時間を短縮し、装置による生産効率を高めることは、実用化において重要な課題である。本報では、マイワシの圧力酵素分解における分解時間の短縮化を目的とし、市販酵素製剤の添加による分解促進について検討を行った結果について報告する。

1. 実験方法

(1) 原料

広島市内の市場において、鮮度の高いマイワシを購入し、実験使用時まで-80℃で凍結保存したものをポリエチレン袋に入れ、流水中で解凍したものを実験に供した。

(2) 酵素製剤

7種類の市販酵素製剤(中性プロテアーゼ)を実験に供した。酵素の名称および起源を表1に示した。

(3) 圧力酵素分解

解凍したマイワシを、家庭用フードプロセッサ(MK-K3, ナショナル(株)製)を用いてミンチにした。ミンチ肉に対して、0~1.0%(w/w)の市販酵素製剤を添加し、

*九州大学大学院農学研究院(〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1)

**広島大学大学院生物圏科学研究科(〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4)

表1 酵素製剤の名称・起源

名称	起源
オリエンターゼ90N	<i>Aspergillus Oryzae</i>
オリエンターゼONS	<i>Aspergillus Oryzae</i>
ヌクレイシン	<i>Bacillus Subtilis</i>
プロテアーゼM「アマノ」	<i>Aspergillus Oryzae</i>
プロテアーゼN「アマノ」	<i>Bacillus</i>
プロテアーゼP「アマノ」3G	<i>Bacillus Subtilis</i>
プロテアーゼA「アマノ」G	<i>Aspergillus Melleus</i>

レトルトパウチに約100gずつ充填・脱気包装した。各試料は、加圧加熱処理装置（光高圧機器株）を用い、各条件（温度・圧力・時間）で圧力酵素分解を行った。分解終了後、沸騰水浴中で10分間加熱して残存酵素を失活させた。未分解の骨・鱗・油等を遠心分離（8,000rpm, 30分間）によって除去し、得られた上清を一晩4℃で冷却後、珪藻土濾過したものを圧力酵素分解液（以下分解液と略す）とした。分解液の回収率（%）は原料ミンチ肉に対する得られた分解液の重量%とした。

(4) 化学分析

分解液の全窒素（T-N）をマクロケルダール法、ホルモール窒素（F-N）をホルモール滴定法によって求めた。分解液中の遊離アミノ酸濃度は、Sogaら²⁾の方法によりキャピラリー電気泳動装置（G1600 series II, agilent製）を用いて測定した。なお、本法ではロイシンとイソロイシンの分離ができないため合計値で表した。分解液の窒素回収率（%）およびタンパク質分解率（%）は以下の式により求めた。

窒素回収率（%）：分解液のT-N（%）×回収率（%）/原料マイワシのT-N（%）

タンパク質分解率（%）：F-N（%）/T-N（%）×100

2. 実験結果および考察

(1) 添加酵素の選択

i) 原料魚の分解状況と分解液の性状

はじめに添加酵素の種類を選択するため、7種類の市販酵素製剤をそれぞれ0.5%（w/w）添加し、50℃、60MPa、24時間圧力酵素分解処理を行った。得られた分解液のT-N（%）、F-N（%）、窒素回収率（%）およびpHを測定した結果を表2に示す。

T-N（%）については、酵素無添加（以下対照と略す）では1.65%であったが、オリエンターゼ90Nで2.65%と最も高い値となり、次いでプロテアーゼN、プロテアーゼPが2.62%、2.59%と高い値を示した。分解液のT-N（%）は市販の魚醤油（1～3%）³⁾、大豆醤油（1.5～1.6% df）⁴⁾と比較しても高い値であった。

F-N（%）については、対照では0.61%であったが、プロテアーゼP、プロテアーゼN、プロテアーゼM、プロテアーゼA添加は1.25%、1.24%、1.23%、1.23%と比較的高い値を示した。

窒素回収率は、添加酵素の種類により大きな差が認められ、オリエンターゼONSが最も高い値の70.9%を示し、酵素添加による著しい分解促進効果が認められた。また、プロテアーゼPについても66.4%と高い値が得られた。一方、対照では、25.7%と著しく低い値を示し、原料の多くが未分解のまま残存していた。このことから、いずれの酵素も窒素回収率の改善に有効に働いているものと考えられた。

タンパク質分解率については、プロテアーゼM、プロテアーゼAにおいてそれぞれ51.4%、50.2%と比較的高い値を示した。

圧力酵素分解液のpHについては、対照では6.42、酵素添加したものでは6.10～6.32であった。酵素添加によってわずかにpHが低下したが、圧力酵素分解液のpHは市販されている魚醤油の値5～6⁴⁾と比べると若干高い傾向があった。魚醤油では、製造中に乳酸菌により生成される乳酸等の有機酸のためにpHが低下することが知られている。本分解液では、圧力で微生物の発育を抑

表2 市販酵素製剤添加がマイワシ圧力酵素分解に及ぼす影響

酵素製剤	T-N（%）*	F-N（%）**	窒素回収率（%）	タンパク質分解率（%）	pH
対照	1.65	0.61	25.7	37.0	6.42
オリエンターゼ90N	2.65	1.05	61.8	39.7	6.21
オリエンターゼONS	2.51	1.13	70.9	44.9	6.20
ヌクレイシン	2.44	1.01	47.2	41.2	6.10
プロテアーゼM「アマノ」	2.39	1.23	55.0	51.4	6.32
プロテアーゼN「アマノ」	2.62	1.24	57.4	47.2	6.21
プロテアーゼP「アマノ」3G	2.59	1.25	66.4	48.1	6.31
プロテアーゼA「アマノ」G	2.45	1.23	58.5	50.2	6.30

* T-N：全窒素 ** F-N：ホルモール窒素

表3 各酵素製剤を添加したマイワシ圧力酵素分解液の遊離アミノ酸含量 (mg/100ml)

アミノ酸	対 照	オリエンターゼ 90N	オリエンターゼ ONS	ヌクレイシン	プロテアーゼ M	プロテアーゼ N	プロテアーゼ P	プロテアーゼ A
Asp	310	380	260	290	450	550	480	430
Glu	830	710	600	640	890	1140	870	900
Gly	230	320	230	260	280	390	310	290
Tau	540	430	410	360	490	610	440	490
Ala	680	730	590	680	770	960	780	800
Ser	350	440	330	410	510	550	550	490
Thr	440	510	440	400	590	740	620	560
Pro	80	90	60	80	200	190	150	180
Val	550	660	580	550	720	960	790	740
Met	380	440	410	450	400	650	540	410
His	550	620	450	500	610	640	540	570
Leu + Ile	1670	1820	1460	1710	1880	2530	2010	1890
Phe	530	540	480	430	610	660	600	530
Lys	200	1000	690	990	1160	1280	1140	1250

制しており、また短時間に分解を行うことから乳酸菌などによる発酵が起こらないため、pHがあまり低下しなかったものと思われる。

いずれの酵素についても分解促進効果が見られたが、オリエンターゼ90N、オリエンターゼONS、プロテアーゼPではT-N2.5%、窒素回収率60%以上となり、分解促進効果の高い酵素製剤であった。特にオリエンターゼONSについては、窒素回収率70%を超えており、圧力酵素分解液の製造において高い生産性ならびに未分解物等の廃棄物の低減化が期待できるものと考えられた。

ii) 分解液の遊離アミノ酸含量

各酵素製剤を添加した圧力酵素分解液中の遊離アミノ酸含量を測定した結果(表3)、旨味系アミノ酸⁵⁾⁶⁾であるグルタミン酸はプロテアーゼN、プロテアーゼA、プロテアーゼM、プロテアーゼPにおいて、870~1140mg/100mlと高い値が得られた。酸味系アミノ酸のアスパラギン酸についてもプロテアーゼN、プロテアーゼP、プロテアーゼM、プロテアーゼAで430~550mg/100mlと高い値を示した。甘味系アミノ酸であるグリシンは、プロテアーゼN、オリエンターゼ90N、プロテアーゼPで310~390mg/100ml、同じく甘味系アミノ酸であるアラニンについてはプロテアーゼN、プロテアーゼA、プロテアーゼP、プロテアーゼMで770~960mg/100mlと高い値を示した。一方、苦味系アミノ酸であるバリンはプロテアーゼN、プロテアーゼPで960mg/100ml、790mg/100mlとなり、同じく苦味系アミノ酸であるロイシン+イソロイシンはプロテアーゼNで2530mg/100mlと著しく高く、プロテアーゼP、プロテア

ーゼA、プロテアーゼM、オリエンターゼ90Nで1820~2010mg/100mlと高い値となった。タウリンは市販の魚醤油³⁾⁴⁾と同様に比較的多く含まれていた。また酵素添加による濃度変化は殆ど認められなかった。

いずれの分解液についても、旨味、酸味、甘味に関係しているアミノ酸が多く含まれる分解液には、苦味に関係するアミノ酸も多く含まれる傾向が見られた。著者らが期待した旨味系・酸味系・甘味系アミノ酸が多く、苦味系アミノ酸が少ない分解液は得られなかった。

以上 i), ii) の結果から、分解促進効果についてはオリエンターゼ90N、オリエンターゼONS、プロテアーゼPが優れていることが分かった。しかし、オリエンターゼ90N、プロテアーゼPについては旨味系、甘味系アミノ酸が多い反面、苦味系アミノ酸の含量も高く、官能的にも強い苦味が感じられた。一方、オリエンターゼONSについては苦味系アミノ酸の含量が低く、官能的にも比較的苦味が少なかったことから、以下の実験では酵素製剤をオリエンターゼONSに絞り、実験を進めた。

(2) 酵素の添加量

酵素の最適な添加量を決定するため、添加酵素をオリエンターゼONS、添加量を0~1.0%とし、50℃、60MPa、24時間圧力酵素分解を行いT-N(%)等の変化を調べた。その結果(表4)、T-N(%)については酵素無添加では1.65%であったが、0.1%添加することにより2.45%と大きく増加し、その後ゆるやかに増加した。また、F-N(%)、タンパク質分解率についても、酵素無添加では0.61%、37.0%であったが、0.1%添加により1.11%、45.2%と大きく増加し、その後ゆるやかに増加

表4 オリエンターゼONSの添加量がマイワシ圧力酵素分解に及ぼす影響

添加量 (%)	T-N (%) *	F-N (%) **	窒素回収率 (%)	タンパク質分解率 (%)
0	1.65	0.61	25.7	37.0
0.1	2.45	1.11	53.5	45.2
0.3	2.56	1.16	55.2	45.3
0.5	2.61	1.21	65.7	46.3
1.0	2.39	1.18	64.5	49.2

*T-N:全窒素 **F-N:ホルモール窒素

した。窒素回収率(%)については0.1%添加で大きく値が増加し、その後漸増して0.5%添加で65.7%とほぼ一定になった。

以上の結果から、酵素の添加量は窒素回収率(%)がほぼ一定となる0.5%とした。

(3) 圧力酵素分解の処理時間

圧力酵素分解における最適な分解時間を決定するため、オリエンターゼONS0.5%, 50℃, 60MPaで0~72時間分解処理を行ったところ(図1), T-N(%), F-N(%), 窒素回収率(%), タンパク質分解率(%)いずれの値についても分解時間の増加と共に24時間まで徐々に増加し、その後ほぼ一定あるいはゆるやかに増加した。24時間処理による分解ではT-N(%), F-N(%), 窒素回収率(%), タンパク質分解率(%)はそれぞれ2.46%, 1.13%, 67.1%, 45.9%であった。また、分解液のT-N(%)やF-N(%)は市販の魚醤油や醤油³⁾⁴⁾と比較しても高い値であった。

以上(1), (2), (3)の結果から、添加酵素としてオリエンターゼONS, 添加量を0.5%, 分解時間を24時間とすることにより、マイワシを原料とした場合でも、カタクチイワシとほぼ同等の濃度の分解液を得られることが分かった。

3. 要約

マイワシを用いた圧力酵素分解技術の実用化を目的とし、市販酵素剤の添加による分解時間の短縮化について検討した。7種類の中性プロテアーゼを用いて実験を行った結果、オリエンターゼONSに最も高い窒素回収率(%)の改善効果が認められた。酵素無添加の場合、

24時間では殆ど分解することができなかったが、添加酵素をオリエンターゼONS, 添加量を0.5% (w/w)とすることでカタクチイワシを用いた場合とほぼ同等の濃度の分解液を24時間で得ることができた。

本研究を行うにあたり、酵素剤を提供して頂きました天野製薬(株), (株)エイチビィアイに御礼申し上げます。

文 献

- 1) T.Okazaki, Y.Shigeta, Y.Aoyama and K.Namba, Autolysis of unsalted fish protein under pressurization. *Fisheries Sci.* **69**, 1255-1260 (2003).
- 2) T.Soga., and G.Ross., Simultaneous Determination of Inorganic Anions, Organic Acids, Amino Acids and Carbohydrates by capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **837**, 231-239 (1999).
- 3) 三枝弘育, タイ, ベトナム, カンボジアおよび日本で製造された魚醤油の成分比較, 東京都立食品技術センター研究報告, **33**, 33-43 (2000).
- 4) 阿部宏喜, 魚醤油の味, *New Food Industry*, **45**, 39-45 (2003).
- 5) 山口静子, 福家真也, 味, 「おいしさの科学」, 第1版, 山野喜生, 山口静子編, (朝倉書店, 東京), pp45-81 (1993).
- 6) 山口勝己, 渡辺勝子, 魚介肉の味とエキス成分, 「魚介類のエキス成分」, 坂口守彦編, (恒星社厚生閣, 東京), pp.104-115 (1988).