

蛋白分解酵素による魚肉分解生成物に関する研究

— いわし肉原料の調味料のペプチド類について —

田代豊雄・白方智子・藤田悦子
松下至*・平岡芳信**

愛媛大学教育学部食品化学研究室

(平成元年10月4日受理)

Studies on Proteolysis Products of Fish Muscles by Protease — On Peptides Contained in Seasoning Solution Produced from Sardine Muscles —

Toyoo TASHIRO, Tomoko SHIRAKATA, Etsuko FUJITA,

Itaru MATSUSHITA*, and Yoshinobu HIRAOKA**

Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Education,

Ehime University, Matsuyama-shi, Ehime 790

(Received October 4, 1989)

Seasoning solution was produced from sardine muscles through proteolysis with the protease and the autolysis solution of *Aspergillus oryzae*. This solution possessed good flavor of sardine as well as good taste.

Proteins, peptides and amino acids in this seasoning solution were analyzed by means of high performance liquid chromatography through the column packed with Asahipak GS-320H.

Peptides were separated from this seasoning solution by gel filtration chromatography, using the column packed with TSK-gel Toyopearl HW40F. The separated peptides taste delicious, sweet or bitter.

Polypeptides were separated from this solution by disc electrophoresis through SDS-polyacrylamide gel, and molecule weights were estimated in nine separated polypeptides.

筆者らは先に¹⁾、愛媛県近海において多獲される魚の食用への多面的利用の観点から、いわし肉に蛋白分解酵素を作用させ、さらに、生成する苦味成分を分解する目的で麹菌自己消化液

* ヤマキ株式会社 · Yamaki Co. Ltd., Iyo-shi, Ehime 799-31

** 愛媛県工業技術センター · Ehime Prefecture Industrial Research Center, Matsuyama-shi, Ehime 790

を添加，作用させ，いわし風味をもつ良好な調味料を作製し得た。

今回はその調味料について，液体クロマトグラフィーのゲル濾過法²⁻³⁾により，蛋白分解生成物（ペプチド類，アミノ酸類など）を分析した。また，蛋白分解生成物のペプチド類を分取して，その呈味を調べ，さらに，電気泳動法によって，蛋白分解生成物の分子量を推定した。

試料および実験方法

1. 試料

(1) アミノ酸類，ペプチド類，蛋白質類

高速液体クロマトグラフィーによる分離・分析を検討するため，つぎの市販標品を使用した。

アミノ酸類：自動分析用アミノ酸混合標準液（和光純薬製），グリシン（M. W. 75），グルタミン酸（M. W. 147），ヒスチジン（M. W. 155），フェニルアラニン（M. W. 165），チロシン（M. W. 181）（以上，和光純薬製）。

ペプチド類：L-ロイシルグリニン（M. W. 188），L-ロイシルグリシルグリニン（M. W. 245），L-グルタミルグリシルセリン（M. W. 291），グリシルグリシルL-チロシルL-アルギニン（M. W. 452），ロイシン-エンケファリン（M. W. 556）（以上，ペプチド研究所製）。

蛋白質類：トリプシンインヒビター（M. W. 28,000），卵アルブミン（M. W. 45,000），牛血清アルブミン（M. W. 68,000），カタラーゼ（M. W. 240,000），フェリチン（M. W. 450,000）（以上，ペーリンガー・マンハイム製）。

(2) ミヨグロビンフラグメント混合物

ディスク電気泳動法により，蛋白質類，ペプチド類の分子量を求めるため，市販標品のミヨグロビンフラグメント混合物（Pharmacia 製）を使用した。

(3) いわし肉

瀬戸内海産の新鮮なまいわし（*Sardinops melanosticta*）（大羽のもの）を使用し，頭，内臓を除き，3枚におろし，魚肉のみをミンチにかけた後，実験に供した。

2. 蛋白分解酵素

つぎの市販の蛋白分解酵素をプロテイナーゼ（エンドペプチダーゼ）として使用した。

パンチダーゼ NP-2（ヤクルト薬品工業製，酵素力価40,000 PU/g）：麹菌（*Aspergillus oryzae*）より得られた淡褐色の粉末で，至適温度40~50℃，至適 pH 6~8である。（以後 NP-2 とする）。

3. 麹菌自己消化液

ペプチダーゼ（エキソペプチダーゼ）の酵素剤として麹菌自己消化液（中性プロテイナーゼ力価480 PU/ml，ロイシンアミノペプチダーゼ力価0.05 PU/ml）を使用した。麹菌自己消化液は醤油麹1kgに対し食塩濃度10%の冷食塩水1.5 l 加え，低温（10℃以下）にて熟成させ，10日後に濾過して得られる。

4. いわし肉を原料にした調味液の製法

いわし肉1kgに対し，蛋白分解酵素（NP-2）10g および麹菌自己消化液500g を加え，50

℃に保った。この時の pH は5.2であった。酵素作用 5 時間および10時間後に加熱殺菌（100℃，5 分間）し，ついで遠心分離（14,500 rpm）し，上澄液を得て，調味液とした。

5. いわし肉原料調味液の一般成分分析

前記の作製された調味液について，一般成分および食塩の分析を行ったが，水分およびエキスは乾燥法，窒素はケルダール窒素定量法，脂質はエチルエーテル抽出法，灰分は直接灰化法，食塩はモールの沈澱法により，常法によって定量した。

6. 調味液成分の高速液体クロマトグラフィー

市販標品のアミノ酸類，ペプチド類，蛋白質類および前記のいわし肉原料調味液について，高速液体クロマトグラフィーを行った。

クロマトグラフは日立製655A-11形を使用し，分析条件はつぎの通りである。

充填剤：Asahipak GS-320H，分離用カラム：7.6mmφ×250mm，溶離液：20mM 酢酸アンモニウム・5%アセトニトリル，pH 6.7，溶離液流速：1 ml / 分，カラム温度：30℃，検出波長：220 nm，試料注入量 2～10μl。

7. 調味液成分の分画分取の液体クロマトグラフィー

前記のいわし肉原料調味液について，呈味成分を分画分取するためのゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

東ソー製クロマトグラフを使用し，その分析条件は次の通りである。

充填剤：TSK ゲルトヨパール HW40F，分画分取用カラム：25mmφ×700mm，溶離液：H₂O，溶離液流速：2 ml / 分，カラム温度：常温（20℃付近）：検出波長220 nm。

試料調味液（酵素作用10時間のもの）は H₂O にて 4 倍稀釈し，7.5 ml を注入展開した。展開開始 1 時間後から，溶出液10 ml（5 分間）ずつ分画分取した。その各分画液について，前記 6 の実験に記載の条件にて，充填剤 Asahipak GS-320H を使用しクロマトグラフィーを行った。又，各分画液の一部を真空凍結乾燥法により乾固し，少量の水にて溶解し，呈味を検した。

8. 調味液成分の電気泳動

前記のいわし肉原料調味液について，ディスク電気泳動を行った。調味液成分の蛋白質類，ペプチド類の分子量を求めるために，ミョグロビンフラグメント混合物を平行して展開させた。

試料0.05 ml に等量の50%グリセリン・2% SDS・6%メルカプトエタノールを含む0.02 Mリン酸緩衝液（pH 7.2）を加え，50℃にて 2 時間保ち，さらに室温にて一晩放置し，ついで0.05% BPB を0.025 ml 添加した。これについて，常法⁴¹に従い，10%濃度ゲルの SDS-ポリアクリルアミドゲルによるディスク電気泳動を行った。泳動は0.1% SDS・0.1Mリン酸緩衝液にて，5mA / チューブで 4 時間行い，12.5%三塩化酢酸にて蛋白質を固定させた後，0.5%クマシーブリリアントブルーにより 1 晩染色し，7%酢酸にて脱染した。

結果および考察

1. いわし肉を原料にした調味液

作製された調味液の一般成分および食塩の含有量を表1に示した。

窒素量は2.5%前後含まれ、假りに蛋白質量(窒素係数6.25)に換算すると15.6%前後でエキス分の大部分を占め、アミノ酸類¹⁾、ペプチド類、蛋白質類などが多量に含まれている。食塩量は2.5%前後で少ない。

この調味液は良好ないわしのにおいをもち、旨味がある。特に酵素作用10時間のものは旨味が強い。

この調味液3に対し淡口醤油2、水100の割合ですまし汁を作った。その風味は良好で、特に酵素作用10時間のものは魚の調味臭があり、旨味が強い。

表1 いわし肉原料調味液の成分含量 (%)

成分	酵素作用	
	5時間	10時間
水分	77.8	76.3
エキス(固形分)	22.2	23.7
窒素	2.6	2.3
脂質	—	0.6
灰分	4.0	4.4
食塩	2.4	2.7

2. 調味液成分の高速液体クロマトグラフィー

(1) 標品アミノ酸類

アミノ酸混合試料のクロマトグラムを図1に、また保持容量の異なる主なアミノ酸類のクロマトグラムを図2に示した。

アミノ酸類のピークは、この条件では、保持容量7.4 ml から10.5 ml の間に存在し、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、セリン、スレオニン、シスチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リジン、プロリンなどのピークの保持容量は7.4 ml から7.8 ml の間にあり、ヒスチジンでは8.5 ml、フェニルアラニンでは10.0 ml、チロシンでは10.5 ml である。

(2) 標品ペプチド類

ペプチド類のクロマトグラムを図3に示した。

アミノ酸の数が2~5のペプチド類についてクロマトグラフィーを行ったが、これらのピークは保持容量6 ml から18 ml の間に出現する。使用した充填剤の Asahipak GS-320 では分子篩の特性によるゲル濾過クロマトグラフィーとともに、展開試料の等電点、疎水度による分配クロマトグラフィーの分析効果があらわれる。低分子のペプチド類では分配クロマトグラフィーの影響が大きく、そのため分子量と保持容量との間には相関性が見いだせない。

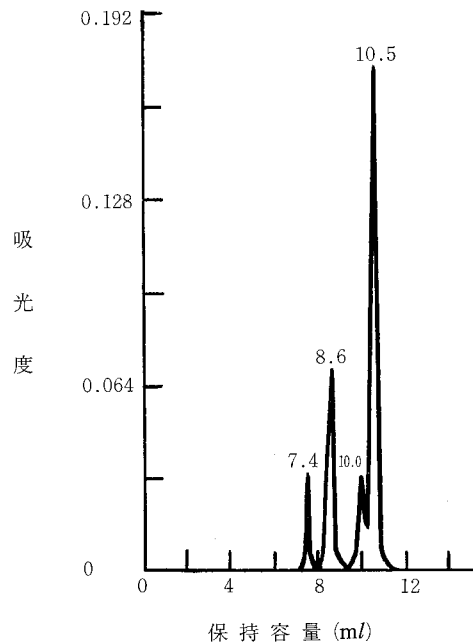


図1 アミノ酸混合試料のクロマトグラム
 充填剤：Asahipak GS-320H
 溶離液：20mM CH₃COONH₄・5%CH₃CN,pH6.7
 (図中の数字は保持容量を示す)

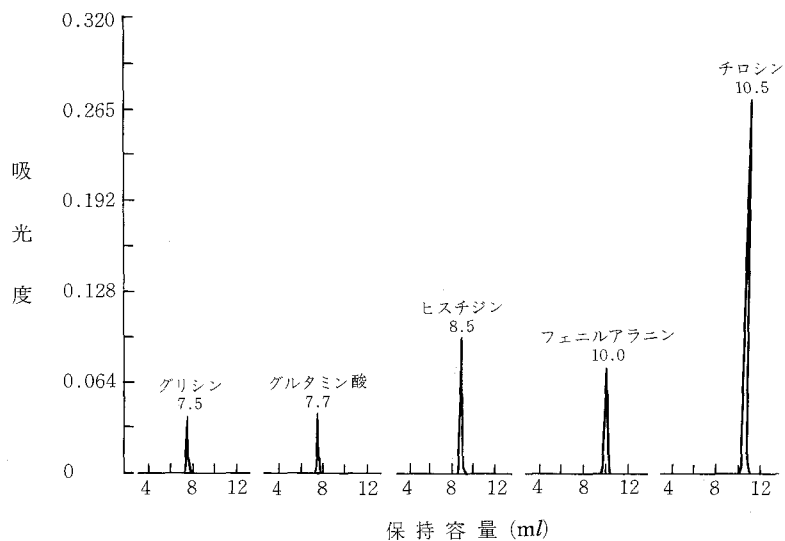


図2 アミノ酸類のクロマトグラム
 充填剤：Asahipak GS-320H
 溶離液：20mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4 \cdot 5\% \text{CH}_3\text{CN}$, pH6.7
 (図中の数字は保持容量を示す)

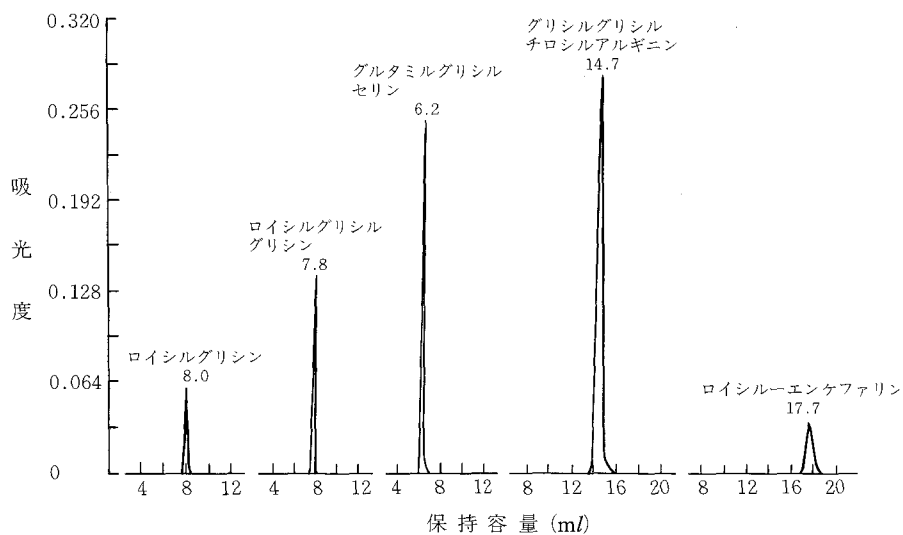


図3 低分子ペプチド類のクロマトグラム
 充填剤：Asahipak GS-320H
 溶離液：20mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4 \cdot 5\% \text{CH}_3\text{CN}$, pH6.7
 (図中の数字は保持容量を示す)

(3) 標品蛋白質類

蛋白質類のクロマトグラムを図4に示した。

蛋白質類は Asahipak GS - 320 の分子篩効果により、この条件では保持容量4.3 ml までに溶出してしまふ。

(4) いわし肉原料の調味液

酵素作用10時間のものクロマトグラムを図5（縦軸の吸光度は省略）に示した。

前記のアミノ酸類，ペプチド類，蛋白質類のクロマトグラム（図1～4）から考察すると、

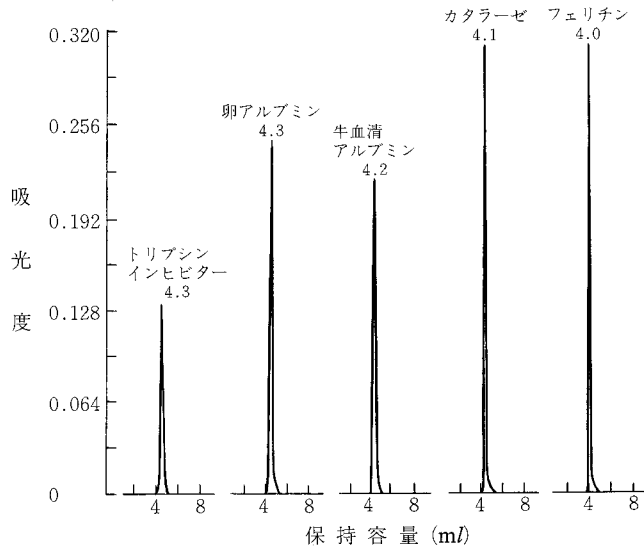


図4 蛋白質類のクロマトグラム
 充填剤：Asahipak GS-320H
 溶離液：20mM CH₃COONH₄・5%CH₃CN,pH6.7
 (図中の数字は保持容量を示す)

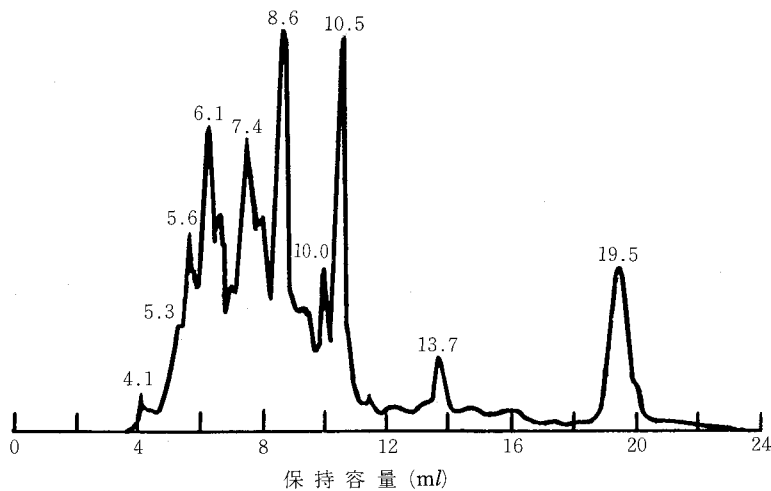


図5 いわし肉原料調味液成分のクロマトグラム
 試料：酵素作用10時間のもの
 充填剤：Asahipak GS-320H
 溶離液：20mM CH₃COONH₄・5%CH₃CN,pH6.7
 (図中の数字は保持容量を示す)

図5における保持容量4 ml 付近のピークは蛋白質で、その量は比較的少ない。保持容量5 ml から20 ml 付近にわたって数多くのペプチド類が含まれており、7.4 ml 付近から10.5 ml 付近にかけて各種のアミノ酸類も比較的多量に存在することが分かる。

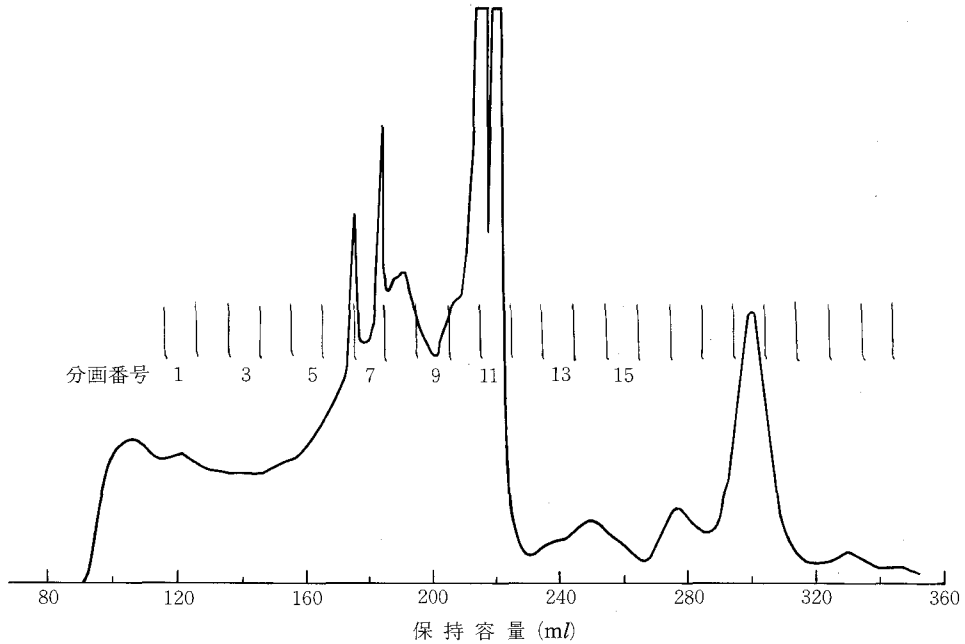


図6 いわし肉原料調味液成分の分画分取のクロマトグラム
 試料：酵素作用10時間のもの
 充填剤：TSKゲルトヨパールHW40F
 溶離液：H₂O

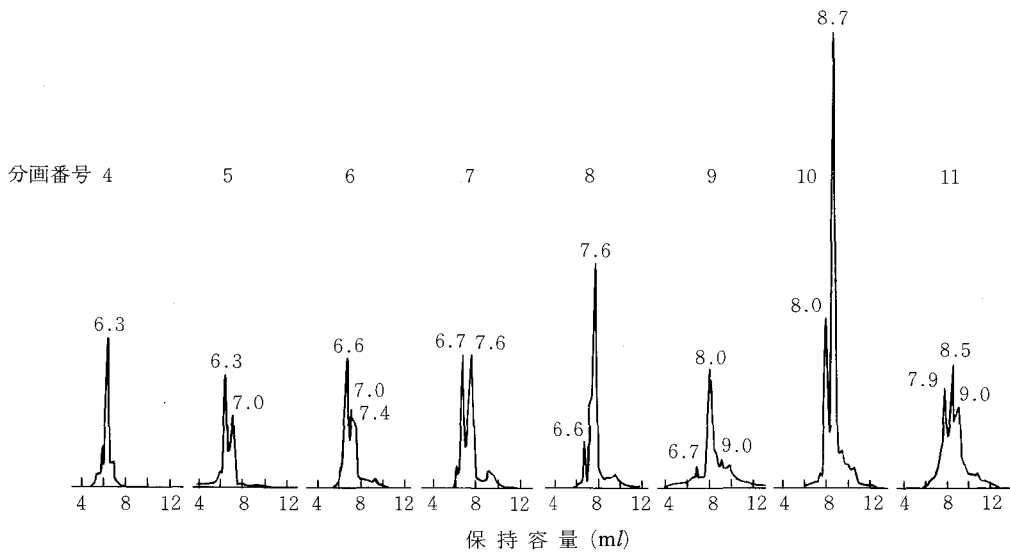


図7 いわし肉原料調味液の呈味成分のクロマトグラム
 充填剤：Asahipak GS-320H
 溶離液：20mM CH₃COONH₄・5%CH₃CN,pH6.7
 (図中の数字は保持容量を示す)

3. 調味液成分の分画分取の液体クロマトグラフィー

トヨパール HW40F による、いわし肉原料調味液（酵素作用10時間のもの）のクロマトグラムを図6（縦軸の吸光度は省略）に示した。図中の数字は分画番号である。その各分画部について Asahipak GS-320H によりクロマトグラフィーを行い、そのクロマトグラムを図7（縦軸の吸光度は省略）に示した。

また、トヨパール HW40F による各分画部について、呈味を調べた。

図6における保持容量100 ml 付近のピークの部分は蛋白質であり、分画番号1～2には高分子ペプチド類が含まれ、3から11までは呈味を示し、低分子ペプチド類が含まれていると推定される。分画番号4～6では旨味を呈し、5が最も強い。8、9では甘味があり、11では苦味を呈する。12以後の分画部ではすべて味が無かった。14以降のピークの部分にはアミノ酸類が含まれている。

図7から分かるように、各分画部は単一成分でなく、1～3種類の主体的なペプチドまたはアミノ酸を含み、それが呈味の根源の成分になっている。

4. 調味液成分のディスク電気泳動

ミヨグロビンフラグメントについて、SDS-ポリアクリルアミドゲルのチューブに展開させたバンドから R_f を測定し、分子量との検量線を求めた。また、調味液成分の蛋白質類、ペプチド類について、 R_f を測定し、検量線から推定された分子量を表2に示した。

表2から分かるように、酵素作用5時間と10時間の調味液について比較すると、長時間のものの方にペプチド類が数多く含まれ、酵素作用の進行を示している。10時間のものでは9種類のポリペプチド類が分離され、これらについて23,000から2,000までの分子量が推定された。分子量2,000以下のペプチド類は電気泳動後の三塩化酢酸処理によってゲルチューブに固定化されず、その後の染色、脱染の過程で流出してしまう。

表2 いわし肉原料調味液の成分（蛋白質類、ペプチド類）の分子量

（ディスク電気泳動法による）

ミヨグロビン フラグメント 混合物	酵 素 作 用	
	5時間	10時間
分子量	推定分子量	推定分子量
17,200	23,400	23,200
14,600	20,100	19,600
8,240	16,000	16,700
6,380	11,600	11,000
2,560	7,950	7,780
	5,180	5,000
	2,400	3,160
		2,630
		2,050

要 約

1. いわし肉に蛋白分解酵素および麹菌自己消化液を添加、作用させ、旨味の強いいわし風味をもつ調味液を作製した。

2. いわし肉原料の調味液について、高速液体クロマトグラフィーを行い、充填剤に Asahipak GS-320H を使用し、蛋白質類、ペプチド類、アミノ酸類を分析した。

3. 前記の調味液について、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、充填剤に TSK ゲルトヨ

パール HW40F を使用し、旨味、甘味、苦味のあるペプチド類を分取した。

4. 前記の調味液について、SDS-ポリアクリルアミドゲルによるディスク電気泳動を行い、分離されたポリペプチド類（9種類）について、分子量を推定し得た。

なお、本研究の概要は平成元年度日本食品工業学会第36回大会（於仙台）において発表した。

文 献

- 1) 田代豊雄・田坂京子・安藤幾代・岡弘康・藤田悦子：愛媛大学教育紀要， 9, 51(1989).
- 2) K. YASUKAWA, M. KASAI, Y. YANAGIHARA and K. NOGUCHI : *J. Chromatogr.*, 332, 287(1985).
- 3) N. HIRATA, M. KASAI, Y. YANAGIHARA and K. NOGUCHI : *J. Chromatogr.*, 434, 71(1988).
- 4) 林健志・大場義樹：蛋白質・核酸・酵素， 17, 304(1972).