

植物性及び動物性ペプチドからのプラステイン作成技術の開発（第1報）

（平成14年度）

研究開発課 葛西大介、大庭 潔、永草 淳
北海道大学大学院水産科学研究科 教授 高橋是太郎

1. 研究の目的と概要

当センターでは平成12年度にばれいしょ澱粉工場の廃液からポテトペプチドの精製技術を開発し、このペプチドにACE阻害活性を見出した。現在、このペプチドは調味料原料として企業から製品化されている。

本研究は植物性のポテトペプチドをさらに高付加価値化するため、動物性ペプチドとの複合による新たな機能性食材の開発を目的として、動物性未利用資源を利用した動物性ペプチド（酵素分解物）及び動物性プラステイン（酵素的再合成ペプチド）の作成技術を開発するとともに、植物性、動物性及びその複合ペプチド、プラステイン各々について機能性食材としての可能性を検討するものである。

本報では動物性未利用資源として北海道を代表する水産廃棄物のひとつであるイカゴロに着目し、これを原料とした動物性ペプチド、プラステイン各々についてその作成技術と機能性を検討した。

2. 試験研究の方法

（1）酵素分解条件（ペプチド作成条件）

前処理：原料のイカゴロをチョッパーにて粗砕し、マスコロイダーにてペースト化後、未加熱及び加熱処理（90℃、30min.）を行い、酵素分解で得たエキスについてケルダール法にて蛋白回収率（エキス中の蛋白重量 / 原料中の蛋白重量 × 100）を算出した。

基質濃度：原料に対する加水を1:0～1:3の割合で行い、酵素分解で得られたエキスについてケルダール法にて蛋白回収率を算出した。

酵素分解：酵素として alcarase2.4L（ホザ仏ス）を使用し、原料蛋白重量に対し2%を添加して60℃、18時間反応を行った。

精製：反応終了後、90℃、30min.加熱して酵素を失活させ、遠心分離を行ってその上清をセライトで吸引し過しエキスを得た。得られたエキスはフリーズドライ（FD）にて乾燥し粉末化した。

（2）酵素的再合成条件（プラステイン作成条件）

基質濃度：粉末化した酵素分解物を加水し、濃度10～50%の基質溶液を調整し、再合成で得られたプラステインについてローリー法にてプラステイン合成率（合成プラステイン中の蛋白重量 / 酵素分解物中の蛋白重量 × 100）を算出した。

反応pH：基質溶液のpHを4～11に調整し、再合成で得られたプラステインについてローリー法にてプラステイン合成率を算出した。

再合成：酵素として alcarase2.4L（ホザ仏ス）を使用し、基質溶液に対し1%を添加して55℃、24時間反応を行った。

精製：反応終了後、90℃、30min.加熱して酵素を失活させ、トリクロロ酢酸（TCA、終濃度20%）を加えて遠心分離を行い、上清をろ過除去してプラステインを得た。得られたプラステインはFDにて乾燥し粉末化した。

(3) 分析・評価方法

アミノ酸分析：遊離アミノ酸は 10%TCA 溶液で抽出し、構成アミノ酸は 6N 塩酸にて酸加水分解を行い、各々PTC (フェニルカカミル) 誘導体を作成して逆相系カラム (TOSO Tsk-gel ODS-80Ts) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

ペプチド含有率：上記で分析した総アミノ酸量から算出 ((総構成アミノ酸量 - 総遊離アミノ酸量) / 総構成アミノ酸量 × 100) した。

分子量の推定：分子量はゲルろ過カラム (TOSO Tsk-gel G-3000PW) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

抗酸化性試験：表 1 の反応液を調整し、試料を供したものと更に酸化促進物質としてヘミンを共存させたものについて、各々未加熱区と加熱 (95 、 2Hrs.) 区を作成し、40 保存下での油脂中の過酸化物量及びフェニルカカミル酸反応生成物量の推移をロダン鉄法及び TBA 法を用いて測定した。

成分	量
99.5%エタノール	10.0ml
50mM リン酸緩衝液	10.0ml
リノール酸	0.14g
試料	0.14mg
水	ml
ヘミン	1.4 μg
計	25ml

3 . 研究の結果と考察

(1) 酵素分解条件 (ペプチド作成条件)

ペースト処理したイカゴロは 90 、 30min.加熱後、1:1 の割合で加水し、酵素を原料蛋白質あたり 2%添加して、60 、 18 時間反応させたときが最も蛋白質回収率が高く、回収率は約 73%であった。イカゴロの脂質含量は 25%もあり、脂質による酵素分解の障害を考慮すると、予め脂質除去ができれば、更なる回収率の向上が期待できるものと考えられた。

(2) 酵素的再合成条件 (プラスティン作成条件)

前項で精製した乾燥粉末を基質濃度 30%となるよう加水し、pH8.0 に調整後、酵素を液量に対し 1%添加して 55 、 24 時間反応させたときが最もプラスティン合成率が高く、合成率は約 32%であった。

(3) 分析、評価

構成アミノ酸組成

精製した酵素分解物及びプラスティンの構成アミノ酸組成を比較分析した結果、その組成比に明確な違いがあり、酵素分解物中のアミノ酸が選択的にプラスティンに合成されたことが示唆された (図 1) 。

ペプチド含有率

プラスティンのペプチド含有率は約 96%であり、ペプチドとして極めて高い精製率であった。

分子量分布

生、酵素分解物、プラスティン各々の水溶性エキスの分子量分布を比較すると、生で存在していた分子量 8000 ~ 150000 のポリペプチドが酵素分解物では分子量 1300 以下のオリゴペプチドまで分解されたことが示唆された。また、酵素分解物中のオリゴペプチドは

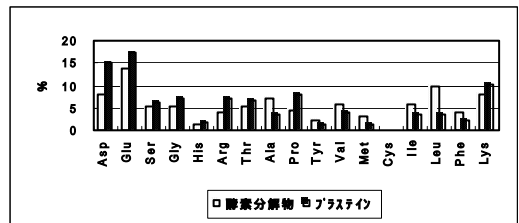
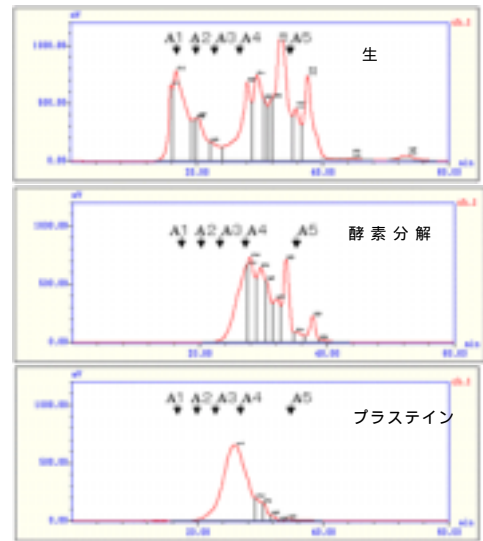


図 1) 構成アミノ酸組成の比



MW A1(69000), A2(23000), A3(5730), A4(337), A5(245)

図 2) 分子量分布の比較

プラステインでは分子量 2000 ほどのペプチドに再合成されたことが示唆され、全ペプチド中の約 87%を占めた(図 2)。

抗酸化性

ロダン鉄法による抗酸化性では、酵素分解物、プラステインともにトコフェロールに比べ優れており、特に加熱処理区では酵素分解物に強い抗酸化性がみられた。

しかしながら、ヘミン共存下では酵素分解物の活性は大きく減少し、プラステインでもトコフェロールと同等であった。TBA 法による抗酸化性においても、加熱処理区において同様の傾向が見られた(図 3、図 4)。

酵素分解物及びプラステインの抗酸化性の違いは各々に含まれるペプチドの分子量の違いによるものと考えられた。

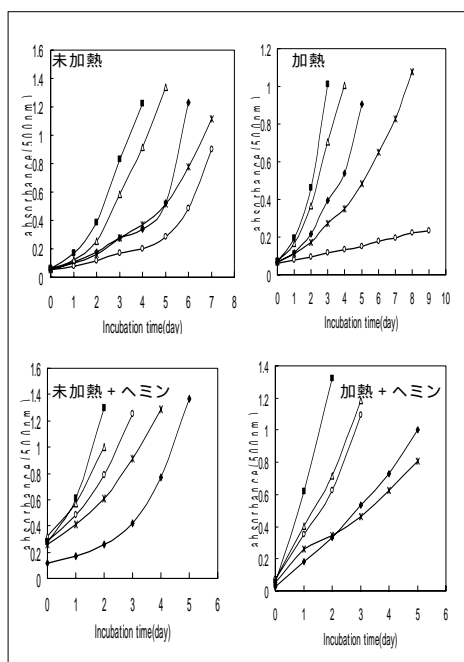


図 3) ロダン鉄法による抗酸化性

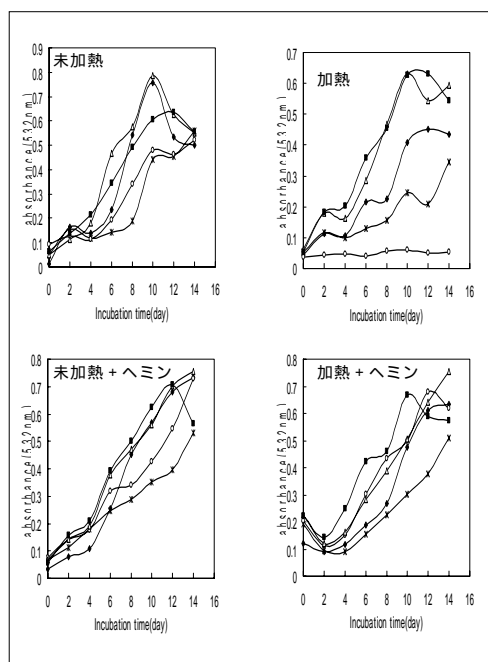


図 4) TBA 法による抗酸化性

コントロール アルブミン トコフェロール 酵素分解物 *プラステイン

4. まとめ

イカゴロペプチド及びプラステイン作成のための酵素分解条件、酵素的再合成条件を蛋白回収率、プラステイン合成率から決定した。また、酵素分解物及びプラステインの持つ抗酸化性は加熱処理を必要とする食品加工において、抗酸化剤としての利用が期待できることを示唆しており、且つ、水溶性物質のため扱いが容易で、幅広い食品に利用できる利点を持つものと考えられ、植物性ペプチドとの複合により多様な機能性を獲得できる可能性が示唆された。

なお、本試験は独立行政法人科学技術振興機構より一部ご協力を受けて実施されたものである。

謝辞 本試験の実施にあたりご協力を賜りました松前町役場水産課様にお礼申し上げます。