

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 (フェニルチオカルバミル) 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 ($(\text{総構成アミノ酸量} - \text{総遊離アミノ酸量}) / \text{総構成アミノ酸量} \times 100$) 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ィッセ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 (プラステイン作成条件)

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イン合成率が高く、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イ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インに合成されたことが示唆された (図 1)。

ペプチド含有率

プラステイ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、プラステイ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

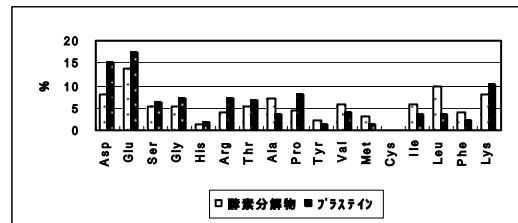
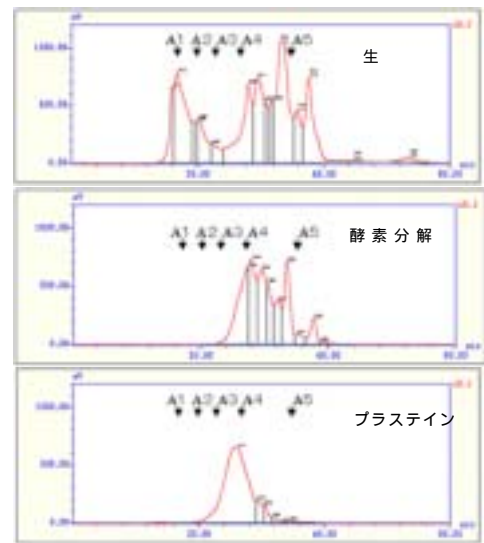


図 1) 構成アミノ酸組成の比



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。

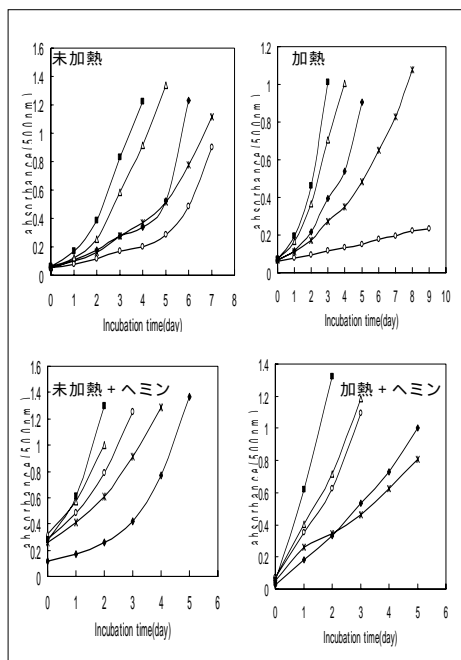


図3) ロダン鉄法による抗酸化性

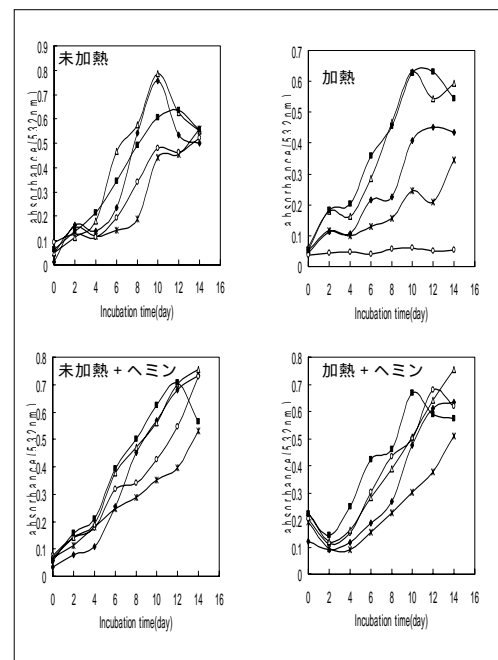


図4) TBA 法による抗酸化性

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。

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2報）

（平成15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

本研究は既に ACE 阻害活性を見出しているばれいしょ澱粉工場廃液から精製したポテトペプチドのさらなる付加価値化を目指し、水産加工廃棄物から得られた動物性酵素加水分解物との複合による新たな機能性食材の開発を目的とする。同時に、酵素加水分解物（以下、ペプチドとする）の酵素的再合成によるプラステインの作成を行い、機能性を高めた食材を意図的に作成する技術の開発を行うものである。プラステイン合成は従来のペプチドでは得られなかった機能性を付与できる可能性があり、今後の食品開発の発展に寄与できるものと確信している。

2．研究の概要

昨年度はイカゴロからのペプチド及びプラステインの作成を行い、これらに抗酸化活性が期待できることを報告した。本報においては、ホタテウロ及びホタテヒモからのペプチド及びプラステインの作成を行い、その機能性を評価するとともに、効率的な機能性食材開発のための作成技術の確立について検討を行った。

3．試験研究の方法

タンパク質分析はケルダール分解法を用いた。ACE 阻害活性は Cushman-Cheung の方法に順じて測定し、IC50 を算出した。抗酸化活性はリン酸緩衝液と乳化剤を加えて乳化したイワシ油にペプチド及びプラステインを添加したときの溶存酸素濃度を測定し、油脂酸化抑制の指標とした。分子量は TOSO Tsk-gel G-3000PW カラムを用いた GPC (HPLC) 分析により推定した。

4．研究の結果と考察

ホタテウロ及びホタテヒモからのペプチド、プラステインの作成は昨年度の酵素条件を用いて作成し、各々、ACE 阻害活性及び抗酸化活性を測定した結果、機能性を期待できるほどの活性は示さなかった。また、プラステイン合成による機能性向上を確認するため、ペプチドとプラステインの機能性を比較したが、その効果に差はなく、むしろペプチドの方が優れている傾向にあった。

ペプチドの機能性が低い理由としては、本試験で使用した酵素分解条件ではタンパク質の分解が進みすぎ、機能性を有するペプチドが分解されて活性が低くなっていることが推測された。

また、プラステイン合成で期待した機能性向上効果が得られなかった理由としては、再合成されたプラステインが機能性を有するペプチドとして合成されなかったことが推測された。

これまでのペプチド作成及びプラステイン作成における酵素条件は原料歩留りを指標とし、タンパク質回収率が最大となる条件を設定していたが、この条件では機能性の付与を期待できないことが判明したため、改めて機能性を指標とした作成条件を設定する必要があった。

そこで、酵素分解におけるペプチドの作成について、ACE 阻害活性の経時変化を測定するとともに、ACE 阻害活性を有するペプチドの分子量を推定するため分子量分布の経時変化を測定した。

この結果、ACE 阻害活性は本条件よりもかなり短時間で活性が最大となり、それ以降では活性が極端に低下していた。また、分子量分布の結果から ACE 阻害活性の経時変化と同様の挙動を示す分子量が存在することが確認された。

次に、抗酸化活性についてもその活性を有するペプチドの分子量を推定するため、当初のペプチド及びプラステインについて分子量分布を測定し、各々の抗酸化活性と比較したところ、活性の強弱に対応する挙動を示す分子量が確認された。また、この分子量サイズは ACE 阻害活性を有すると思われるペプチドとほぼ同じ分子量サイズであった。

これらのことから、ACE 阻害活性及び抗酸化活性を有するペプチドはほぼ同じ大きさの分子量であり、ACE 阻害活性が最大となる条件において抗酸化活性も向上する可能性があると考えられた。

そこで、ACE 阻害活性が最大となる酵素分解時間を機能性ペプチド作成の条件とした。

5. まとめ

新たな機能性食材の開発を目的とし、水産加工廃棄物からの機能性ペプチド及びプラステイン作成について検討した。機能性ペプチドの作成条件は ACE 阻害活性の経時変化から、活性が最大となる条件を見出した。ACE 阻害活性に寄与するペプチドの分子量が抗酸化活性に寄与するペプチドの分子量と同等のサイズであることが推測されることから、新たな作成条件において抗酸化活性も向上する可能性があった。

今後、分子量分画により機能性画分の確認を行うとともに、抗酸化活性の再評価を行うことで機能性ペプチド作成条件を確定することができると考えられる。

また、本報では機能性プラステインの作成条件確立まで至らなかったが、今後、機能性を有するペプチドの分子量を指標として、その分子量を多く含むプラステインの作成条件を酵素反応条件、原料ペプチドの分子量分布などから検討し、機能性食材の意図的な作成技術を開発する予定である。

なお、本研究は（独）科学技術振興機構よりご協力を受けて実施されたものである。