

イカ肉の高度有効利用に関する研究

食品・環境科 主任研究員 玉屋 圭
総合水産試験場 水産加工開発指導センター 主任研究員 桑原 浩一

イカ肉の未利用部分（脚、ひれ部分）の高度有効利用を目的として、酵素分解エキスの製造法確立を試みた。至適 pH の異なる市販酵素 5 種から選定したアルカリプロテアーゼを用いて、酵素分解エキスを調製し、イカタンパク質の分解率を評価した。酵素濃度及び反応時間を検討した結果、0.5wt%、5 時間で製造されたエキスが最も高い分解率を示した。さらに、アンジオテンシン I 変換酵素阻害性を評価した結果、0.18mg/ml と高い活性が得られた。

1. 緒言

蒲鉾や竹輪などのねり製品の製造には、主にスケトウダラなどの魚肉を原料とする冷凍すり身が使用されている。本県の総合水産試験場では、イカ肉のみを原料として、ねり製品を製造する技術を開発した。

本研究では、イカすり身の練り製品を製品化することを目的として、冷凍イカすり身の製造技術並びに長期保存技術の開発を行う。また、イカすり身の有する健康機能性を、実験動物を用いて *in vivo* レベルで検証する。工業技術センターでは、すり身加工時に排出される脚肉や鰭肉等の利用法として、これら素材を原料とした酵素分解エキスの製造法を検討し、調味料の開発を実施する。

2. 実験方法

① 試料調製

試験には市販の生スルメイカを用いた。イカ肉の処理法は以下のものである。胴肉を切り開いた後に、内臓を除去し、胴肉部と脚、ひれ部分を得た。これら水洗した後に、水切りし、酵素分解に供した。

② 酵素分解法

イカ肉の酵素分解は松井らの方法¹⁾に準じて実施した。イカ肉（胴肉部、脚、ひれ）重量に対して10倍量の脱イオン水を添加し、ホモジナイザーにより処理（3,500rpm、3 分間）を行った。次に、各種プロテアーゼの至適 pH に調整して、イカ肉重量に対して 1%wt のプロテアーゼを添加した。1 分間攪拌した後に、各酵素の至適温度（45、50、60℃）で 5 時間インキュベーションを行った。pH を 7.0 に調整し、98℃で 15 分間加熱処理を行い、酵素を失活させた。遠心処理

（10,000rpm、15 分間）を行い、得られた上清をろ過（No.5C）し、酵素分解液を得た。

③ 酵素分解エキスの窒素量測定

イカ肉エキスの窒素量はケルダール法²⁾により実施した。

④ 平均ペプチド鎖長の測定

平均ペプチド鎖長は TNBS（2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸法³⁾により測定した。酸加水分解前後の試料 25μl（6 mg/ml）に対して、0.1M TNBS 溶液 25μl を添加し、37℃で 20 分間反応させた。次いで、分光光度計により 416nm での吸光度を測定した。加水分解前の吸光度を Ab、分解後の吸光度を Aa としたときの Aa/Ab の比を平均ペプチド鎖長とした。なお、酸加水分解は 1%フェノールを含む 6M 塩酸を用いて 150℃、3 時間反応を行った。

⑤ 酵素濃度の検討

イカ肉重量に対して 0.1、0.3、0.5、1%wt のプロテアーゼを添加した。1 分間攪拌した後に、本酵素の至適温度（50℃）で 5 時間インキュベーションを行った。pH を 7.0 に調整し、98℃で 15 分間加熱処理を行い、酵素を失活させた。遠心処理（10,000rpm、15 分間）を行い、得られた上清をろ過（No.5C）し、酵素分解液を得た。酵素分解エキスのエキス量及びホルモール窒素量を測定することにより、イカタンパク質の分解に適した酵素濃度を決定した。なお、イカ肉エキスのホルモール窒素量はホルモール法⁴⁾により測定した。

⑥ 反応時間の検討

イカ肉に対して0.5%wtのプロテアーゼを添加し、50℃で3、5、10、15、24時間インキュベートを行った。酵素を失活させた後、遠心処理、ろ過を行い、酵素分解液を得た。酵素分解エキスのエキス量及びホルモール窒素量を測定することにより、イカタンパク質の分解に適した反応時間を決定した。

⑦ 酵素分解エキスのACE阻害性の測定

イカ肉酵素分解エキスのACE阻害性の測定については、松井らの方法¹⁾に従って行った。測定サンプル50μlに対して、ACE(0.025U/ml、ウサギ肺由来、シグマ製)100μlを添加し、37℃、5分間プレインキュベートした。その後、ACEの疑似基質Hip-His-Leu 12.5mM溶液を100μlを加え、37℃で60分間反応を行った。0.5M塩酸250μlを添加し、反応を終了させた後に、酢酸エチル1.5mlを添加し、ボルテックスで撹拌した。遠心処理(2500rpm、10分間)に供し、上層部の酢酸エチル相0.5mlを試験管に分取した。酢酸エチルを真空遠心機により完全に除去した後に、1.0M NaCl溶液1.0mlを添加し、よく撹拌させた。生成した馬尿酸を溶解させた後、分光光度計を用いて228nmで吸光度を測定した。ACE阻害活性はサンプル溶液の吸光度をAS、サンプルの代わりに水を加えた時の吸光度をAC、水にあらかじめ反応停止液(0.5M塩酸)を加えて反応させた時の吸光度をABとして以下の式からACE阻害率を求めた。

$$\text{阻害率}(\%) = \{ (AC - AS) / (AC - AB) \} \times 100$$

なお、阻害率が50%を示した時の酵素反応時のサンプル濃度をIC₅₀値と定義し、ACE阻害活性の尺度とした。

⑧ 酵素分解エキスの遊離アミノ酸分析

イカ肉の酵素分解エキスに含まれる遊離アミノ酸の測定は鈴木の方法⁵⁾に従って行った。エキスの乾燥物100mgを超純水3mlに溶解した後に、エタノール9mlを添加し、1時間抽出した。ろ過後に、75%エタノールを加え、20mlに定容した。試料溶液を減圧濃縮に供した後に、試料希釈液10mlに溶解し、0.45μmのフィルターでろ過した。アミノ酸分析は日本電子製全自動アミノ酸分析装置JLC500により行った。

3. 実験結果

① 市販酵素によるイカ肉の分解エキスの製造

至適pHの異なる(pH4.5、7.0、8.0、10.0)市販酵素5種類を用いて、イカ肉の酵素分解エキスを調製

した。

表1. イカ酵素分解エキス製造に使用した酵素剤

供試 酵素名	pH	温度 (℃)	由来
酵素A	4.5	50	<i>Aspergillus oryzae</i>
酵素B	7.0	50	<i>Aspergillus oryzae</i>
酵素C	8.0	45	<i>Aspergillus mellus</i>
酵素D	10.0	50	<i>Bacillus licheniformis</i>
酵素E	10.0	60	<i>Bacillus subtilis</i>

まず、各酵素による水溶性エキスの生成量を確認したところ、至適pHを酸性側に有する酵素Aが最も高い値を示した。また、エキスを凍結乾燥に供して、乾燥粉末を調製し、その重量を測定した。その結果、粉末量に全く差異は無かったが、用いた原料に対する重量比を算出したところ、酵素Aが最も高い重量比を示した。

表2. イカ酵素分解エキスの製造特性

供試 酵素名	エキス量 (ml)	乾燥粉末 (g)	重量比 (%)
酵素A	35.7	2.0	19.1
酵素B	25.3	2.0	17.8
酵素C	28.8	2.0	18.5
酵素D	28.2	2.1	18.6
酵素E	27.5	1.9	17.2

次に、各酵素のイカタンパク質に関する分解挙動を確認するために、エキス乾燥粉末に含まれる窒素量をケルダール法により測定した。その結果、どの酵素剤に関しても同程度の窒素量を示したが、特に酵素Dが高い含量を示した。また、タンパク質から分解生成した低分子ペプチドを測定するために、平均ペプチド鎖長を測定した。この値が小さいほど、イカタンパク質がプロテアーゼにより分解され、ペプチドやアミノ酸に低分子化されていることになる。各種酵素剤によ

表3. イカタンパク質の分解特性

供試 酵素名	窒素量 (乾燥粉末 あたりの%)	平均 ペプチド 鎖長
酵素A	11.8	3.8
酵素B	12.9	3.5
酵素C	12.6	4.1
酵素D	13.7	2.5
酵素E	12.8	4.7

るエキスを測定に供した結果、4種の酵素（A、B、C、E）が3～5といった値であったのに対して、酵素Dのみが2.54と低い値を示し、タンパク質をより低分子化していることが予想された。

さらに、イカ酵素分解エキスの高付加価値化を目的として、ACE阻害活性測定を実施した。ACEは、肺や血管壁に存在する酵素であり、アンジオテンシンⅠを強力な昇圧ペプチドであるアンジオテンシンⅡに変換する反応を触媒する。従って、このACEを特異的に阻害する物質が本酵素分解エキに含まれているならば、高血圧発症を予防できる食品素材となりうるということが考えられる。

表4．イカ酵素分解エキスのACE阻害性

供試酵素名	IC ₅₀ (mg-protein/ml)
酵素A	0.54
酵素B	0.52
酵素C	0.48
酵素D	0.44
酵素E	0.35

表4に示すように、どの分解物もACE阻害性を示したが、特に至適pHを塩基性側に有する酵素D及びEが高いACE阻害性を示した。その値は0.44並びに0.35mg-protein/mlであった。

松井らはイワシ筋肉をアルカリプロテアーゼによる分解に供し、酵素分解物が高いACE阻害性（0.26mg-protein/ml）を有することを示している¹⁾⁵⁾。さらに、分解物やそこに含まれるジペプチドVal-Tyrが*in vivo*で血圧低下作用を示すことが明らかになっている⁶⁾。従って、今回検討したイカエキスは、IC₅₀が0.35と高活性値を有しており、生体レベルで血圧低下作用を示す可能性を示していた。

以上の検討により、イカ肉の酵素分解エキスの製造には至適pHを塩基性側に有する酵素が適していると考えられた。以後の検討には本酵素を使用することとした。

② 酵素濃度のイカ肉分解に及ぼす影響

酵素濃度を0.1、0.3、0.5、1.0%に設定して、イカ肉酵素分解エキスを調製した。まず、水溶性エキスの生成量を確認したところ、酵素濃度が増加するほどエキス生成量は増大していた。しかしながら、その増大は0.5%で一定（18.6%）となり、1.0%では大きな増大は認められなかった。

表5．酵素濃度のエキス製造に及ぼす影響

酵素濃度（%）	エキス化率（%）
0	7.2
0.1	15.9
0.3	18.1
0.5	18.6
1.0	19.5

次に、酵素濃度のイカ肉タンパク質の分解に及ぼす影響を確認するために、エキスに含まれるアミノ態窒素（ホルモール窒素）量を測定した。その結果、酵素濃度が増加するに従って、ホルモール窒素量は増大していたが、0.5%で一定（2.72%）に達していた。この結果から、イカ肉タンパク質が酵素作用により分解され、アミノ酸やペプチドなどに低分子化されていることが示唆された。

表6．酵素濃度のイカ肉タンパク質の分解に及ぼす影響

酵素濃度（%）	ホルモール窒素量（乾燥粉末あたりの%）
0	2.28
0.1	2.57
0.3	2.60
0.5	2.72
1.0	2.60

次に、酵素濃度がエキスのACE阻害性に及ぼす影響を検討した。

表7．酵素濃度のACE阻害性に及ぼす影響

酵素濃度（%）	IC ₅₀ （mg/ml）
0	3.51
0.1	0.41
0.3	0.36
0.5	0.25
1.0	0.23

表7に示すように、酵素濃度の増加に伴ってACE阻害性は増大する傾向にあり、特に0.5%濃度で活性は最大（0.25mg/ml）に達していた。以上の結果から、イカタンパク質の分解程度、ACE阻害性を考慮すると、本酵素分解エキに用いる最適な酵素濃度は0.5%と考えられた。

③ 反応時間のイカ肉分解に及ぼす影響

さらに、酵素分解を行う反応条件を決定するために、反応時間に関する検討を行った。時間は3、5、10、

15、20、24時間に設定し、酵素濃度は上記の検討で決定した0.5%で実施した。

表8．反応時間のエキス製造に及ぼす影響

反応時間 (h)	エキス化率 (%)
0	5.2
3	19.3
5	20.8
10	23.6
15	21.7
20	22.2
24	22.7

まず、反応時間のエキス化率に及ぼす影響を検討した結果、時間延長に伴って増大する傾向にあり、10時間(23.6%)で最大に達していた。

表9．反応時間のイカ肉タンパク質分解に及ぼす影響

反応時間 (h)	ホルモール窒素量 (乾燥粉末あたりの%)
0	2.34
3	2.56
5	2.86
10	2.78
15	3.03
20	2.97
24	3.00

次いで、ホルモール窒素量を測定し、タンパク質の分解性を検討したところ、5時間でほぼ一定の値(2.86%)に達しており、10時間以降は大きな増加は認められなかった。この結果から、5時間の時点でタンパク質が分解されて、呈味性及び機能性を有するアミノ酸やペプチドが生成されていることが示された。

表10．反応時間のACE阻害性に及ぼす影響

反応時間 (h)	IC ₅₀ (mg/ml)
0	3.30
3	0.21
5	0.18
10	0.21
15	0.24
20	0.25
24	0.24

上記の検討と同様に、反応時間のACE阻害性に及ぼす影響を検討した。反応時間の進行と共に、阻害性

は増大していたが、5時間で最大(0.18mg/ml)に達していた。

以上の検討により、イカ肉酵素分解の最適反応時間は、タンパク質分解並びにACE阻害性を考慮して5時間であることが判明した。

本酵素分解エキスの反応条件については、酵素濃度0.5%、反応時間5時間を採用することとした。

表11．イカ肉酵素分解エキスに含まれる遊離アミノ酸

	% (エキス乾燥粉末あたり)
Tau	11.6
Asp	1.9
Thr	0.8
Ser	0.7
Glu	4.3
Gly	0.7
Ala	2.6
Met	1.5
Ile	1.2
Leu	2.9
Tyr	2.1
Phe	2.3
His	2.3
Ans	1.2
Car	1.8
Arg	4.2
Pro	4.9

イカエキスに含まれる遊離アミノ酸を分析した結果、最も高い含量を示したのはタウリンであり、次いでプロリン、グルタミン酸、アルギニンであった。タウリンはコウイカ、ヤリイカ、スルメイカなどのイカ類⁷⁾に多く含まれており、生イカ肉に含まれる成分がそのままエキスに移行していた。また、旨味成分であるグルタミン酸、アスパラギン酸⁸⁾も4.3%、1.9%と高含有であり、エキス自体の味が良好であることが推察された。近年、いくつかの健康機能が報告されているカルノシン、アンセリンも含まれており、本研究で検討した血圧低下作用以外の機能を有する可能性が示唆された。

まとめ

本研究では、イカ肉を原料とした調味料を開発することを目的として、酵素分解エキスの製造を試みた。

呈味性を有するアミノ酸、ペプチドを豊富に含有するエキスを製造するために、食品工業用酵素を用いて

イカタンパク質の分解を試みた。至適 pH が塩基性側にある市販酵素を用いた際の酵素分解条件（酵素濃度、反応時間）を水溶性エキスの製造量、エキス中の窒素量、ACE 阻害性を測定することにより検討した。その結果、酵素濃度としては0.5%、反応時間は5時間が最適であることを確認した。また、酵素分解エキスに含まれる遊離アミノ酸を測定した結果、呈味性や機能性を有するものが多く含まれていた。今後は、調味料の製品化を目指して、製造現場でのスケールアップ試験などを実施していく予定である。

本研究は長崎県試験研究機関連携プロジェクトとして、長崎県工業技術センター、長崎県総合水産試験場（中核機関）、水産総合研究センター中央水産研究所、長崎蒲鉾水産加工業協同組合が参画して平成19年度から3年間研究推進を行った。

参考文献

- 1) T. Matsui, H. Matsuifuji, E. Seki, K. Osajima, M. Nakashima, Y. Osajima: Biosci. Biotech. BioChem., 57(6), 922-925(1993)
- 2) 東京大学農芸化学教室編：実験農芸化学上巻，116（1967）
- 3) 中村通ら：日本食品科学工学会、38、377 - 383（1991）
- 4) 財団法人日本醤油研究所編：しょうゆ試験法、19 - 21（1985）
- 5) 日本食品科学工学会編：新・食品分析法、501 - 504（1996）
- 6) H. Matsui, T. Matsui, E. Seki, K. Osajima, M. Nakashima, Y. Osajima: Biosci. Biotech. BioChem., 58(12), 2244-2245(1994)
- 7) 坂口守彦編：魚介類のエキス成分；無脊椎動物の含窒素化合物、9 - 24（1988）
- 8) 網野裕右：分子構造と味覚、食品と容器、43(4)、208（2002）
- 9) 柳内延也、塩谷茂信、水野雅之、鍋谷浩志、中嶋光敏：チキンエキス由来アンセリン - カルノシン混合体の抗酸化活性：植物由来抗酸化物質との比較、日本食品科学工学会誌51(5)、238 - 246（2004）