

機関番号：32608

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580224

研究課題名 (和文) 乾岩海苔に存在する 5' -AMP デアミナーゼの熱安定性に関する研究

研究課題名 (英文) Study of heat stability mechanism of 5' -AMPdeaminase in dried Iwa-nori

研究代表者

村上 昌弘 (MURAKAMI MASAHIRO)

共立女子大学・家政学部・教授

研究者番号：70134517

研究成果の概要 (和文)：乾岩海苔は、高級伝統食品の一つであり、旨味成分であるイノシン酸を含有し、その生成には酵素が関与している。この酵素は、乾岩海苔中では加熱に対して安定である。本研究では、乾岩海苔の独特な呈味を形成するイノシン酸と遊離アミノ酸の含有量を測定した。また、本酵素は、水が付与されると熱安定性を失い、酵素活性の発現にはカルシウムやマグネシウムが必要であった。さらに、本酵素の単離・精製を試みた。

研究成果の概要 (英文)：Dried Iwa-nori is one of the traditional foods and contains 5' -inosinic acid produced by 5' -AMPdeaminase. This enzyme in the Dried Iwa-nori is stable by heat. In this study, contents of 5' -inosinic acid and free amino acids were measured. Activity of this enzyme was lost by heat under aqueous condition and Ca or Mg was necessary to express and stabilize this enzyme. Isolation and purification of this enzyme were tried by chromatography.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：岩海苔、5' -AMP デアミナーゼ、酵素 5' -IMP、5' -AMP、うま味、安定性、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

乾岩海苔は、独特な旨味を持つ高級な食材で、静岡県西伊豆地方では岩海苔をシート状に乾燥し、乾海苔にした岩海苔を火で炙り、手でもみほぐした後に、少量のお湯と醤油をかけてよく混和してから食す独特な食べ方がある。これは、岩海苔に含まれる AMP デア

ミナーゼに水分を付加することにより 5' -IMP の生成を促進し、旨味を増強できるものと考えられる。また、火で炙っても酵素活性が失活しないことに興味をもち、岩海苔の呈味成分の分析と AMP デアミナーゼを単離・生成し、諸性状を検討し、酵素の熱安定性についての研究を提案した。

2. 研究の目的

乾海苔は、独特の旨み、香りを有し、古くから日本人に親しまれ、栄養的にも優れている伝統食品である。アマノリ(甘海苔)の名に由来するように、海苔を良く噛んで味わうと、特に海苔独特の旨み、甘味、こくが強く感じられる。呈味発現には、著量に存在するグリシン、アラニン、グルタミン酸などの遊離アミノ酸に加えて、5'-IMP(イノシン酸)の関与が示唆されている。5'-IMPは、魚肉、畜肉の主要な旨み成分であるが、植物性食品に含まれることは希で、乾海苔以外に呈味に関与しているとする報告例はない。これまで、乾海苔中の5'-IMP含量については、野田ら、中村らなどにより報告されているが、その分析値に大きなバラツキが認められた。これに関して、荒木らは5'-IMPの生成には、乾海苔中に含まれる5'-AMPが酵素的に5'-IMPに変換されることを示唆している。すなわち、乾海苔には不活性型の5'-AMPデアミナーゼが存在し、水に浸漬することにより酵素活性が賦活化され、5'-IMPが急激に増加している。このことが、海苔の5'-IMP含量のバラツキの原因であるとしている。前述したように、海苔を良く噛んで味わうと、海苔独特の呈味が強く感じられることは、唾液に含まれる水分により5'-AMPデアミナーゼが活性化されることに由来すると考えられる。また、海苔は、おにぎりに用いたり、暖かいご飯とともに食することが多い。これは、ご飯に含まれる水分が、5'-AMPデアミナーゼを賦活化し、5'-IMPの生成を促進する結果と考えられる。しかし、周知のように乾焼海苔は、乾燥、焙焼工程を経て食される加工食品である。高温の焙焼工程を経ても何故、5'-AMPデアミナーゼ活性が保持されているか?これは酵素的にも極めて興味深い現象であり、申請者らは強く興味を引かれた。申請者らは、乾海苔の含窒素エキス成分の呈味に関する研究を行う過程で、静岡県西伊豆地方では岩海苔をシート状に乾燥し、乾海苔にした岩海苔を火で炙り、手でもみほぐした後に、少量のお湯と醤油をかけてよく混和してから食す独特な食べ方があることを知った。実際に食してみると、海苔の風味が良くでて、特に旨みが強く感じられた。

本研究においては、5'-AMPデアミナーゼの諸性状の解明を最終目的とし、岩海苔に含まれる遊離アミノ酸、核酸関連物質、有機酸などの呈味に関わる成分の分析、5'-AMPデアミナーゼの熱安定性、5'-AMPデアミナーゼの単離精製の検討を行うものである。

3. 研究の方法

(1)乾岩海苔の呈味成分の分析

①試料

試料の乾岩海苔は、西伊豆で生産された価格が、10帖当たり3200円、5300円、6200

円のものを用いた。

②試料エキスの調製

乾岩海苔そのままの試料、乾岩海苔を40℃のお湯に5分間浸漬した試料、乾岩海苔を200℃で5分間焙焼した試料、200℃で5分間焙焼後40℃のお湯に5分間浸漬した4種の試料につき過塩素酸抽出法により分析試料を調製した。

③遊離型、結合型アミノ酸分析

日立L-8500A型自動アミノ酸分析計を用いてアミノ酸組成を測定した。

④核酸関連物質の分析

核酸関連物質は、島津高速液体クロマトグラフィーLC-10Aと三菱MCL GEL CDR10を用いる分析システムを用いて行った。分析条件は以下の通りである。

カラム:三菱MCL GEL CDR10(250×4.6mm i. d.)

移動相:1M酢酸:1M酢酸ナトリウム(9:1)

流速:1ml/min

検出波長:254nm

カラム温度:40℃

(2)乾岩海苔中の5'-AMPデアミナーゼの安定性の検討

①以下、試料の乾岩海苔は、西伊豆で生産された価格が、10帖当たり3200円のものを用いた。

②試料エキスの調製法

乾岩海苔と200℃で5分間焙焼した乾岩海苔1gを40℃、70℃、100℃の蒸留水25mLに1、5、30分間浸漬した後、60%過塩素酸溶液4mLを加えた後、(1)~③に準じた過塩素酸抽出法で試料エキスを調製し、(1)~④のHPLCの条件で活性を測定した。

(3)5'-AMPデアミナーゼの安定性の検討

①粗酵素液の抽出法

細断した乾岩海苔約1gと海砂1gを混合したものに3mLの2-メルカプトエタノールと10mMのCaCl₂を含むトリス-酢酸緩衝液(pH6.5)を30mL加え、氷で冷やししながらホモジナイズした。抽出液をガーゼでろ過した後、0℃、10000回転で遠心分離を行った。上澄みをトリス-酢酸緩衝液(pH6.5)に対して透析した後、同緩衝液で50mLに定溶した。

②酵素活性測定法

粗酵素液2mLに対しAMPを20μL加え、40℃で5分間放置後、エタノールを6mL加えて酵素反応を停止した。エバポレーターで溶媒を留去した後、2mLの蒸留水に溶解し、1~④と同じ条件でHPLC分析に付した。

③粗酵素液の処理

aからcの条件で処理した酵素液を1~④と同じ条件でHPLC分析に付した。a.低温(5℃、25℃、40℃)における酵素の安定性 b.高温(70℃、100℃)における酵素の安定性 c.2価イオン(Ca²⁺、Mg²⁺)の存在、非存在下における酵素の安定性

(4)5'-AMPデアミナーゼの単離・精製の検討

①粗酵素液の抽出法

単離・精製に用いる粗酵素液は、(3)-②に準じて調製した。

②硫酸分画

粗酵素液は、硫酸アンモニウムの 70%飽和で、5℃一晩放置後、0℃、15000 回転、30min 遠心分離を行い、各種クロマトグラフィー用の試料とした

③限外ろ過

硫酸分画後、10mM の CaCl₂ を含むトリス-酢酸緩衝液 (pH6.5) に溶解した粗酵素溶液を限外分子量 10000 の限外ろ過に付した。

④ゲルろ過クロマトグラフィー

ゲルろ過クロマトグラフィーの条件は以下の通りである。

カラム：TOYOPEARL HW-50F (1000mm×14mm i. d.)

移動相：20mM リン酸緩衝液

流速：1ml/min

検出波長：280nm

また、各フラクションの酵素活性を(3)-③に準じて測定した。

⑤陰イオン交換クロマトグラフィー

陰イオンクロマトグラフィー条件は以下の通りである。

カラム：TOYOPEARL SuperQ-650M (300mm×14mm i. d.)

移動相：

A 50mM トリスリン酸緩衝液 (pH8.3)

B A + 1M NaCl

A→B リニアグラジエント (90min)

流速：1ml/min

検出波長：280nm

カラム温度：室温

また、各フラクションの酵素活性を(3)-③に準じて測定した。

⑥陽イオン交換クロマトグラフィー

陽イオンクロマトグラフィーの条件は以下の通りである。

カラム：TOYOPEARL SP-650M (300mm×14mm i. d.)

移動相：

A 20mM リン酸緩衝液 (pH6.0)

B A + 1M NaCl

A→B リニアグラジエント (90min)

流速：1ml/min

検出波長：280nm

また、各フラクションの酵素活性を(3)-③に準じて測定した。

4. 研究成果

(1)乾岩海苔の呈味成分の分析

①乾岩海苔中の遊離型、結合型アミノ酸の含有量

岩海苔の遊離アミノ酸の分析結果を表 1 から 4 に示した。いずれの試料においても Tau、Glu、Ala 含量が高く、岩海苔の呈味に
関与しているものと考えられた。しかしなが

ら、40℃のお湯に浸漬した岩海苔、200℃で焙焼した岩海苔において、それぞれのアミノ酸に大きな変動は認められず、それぞれの処理は、遊離アミノ酸組成に大きな影響を与えないことが、判明した

表 1 乾岩海苔の遊離アミノ酸組成 (mg/100g)

	3200 円	5300 円	6200 円
Tau	1590	1059	1070
Asp	343	76	106
Ser	177	38	126
AspNH ₂	71	62	30
Glu	520	190	225
GluNH ₂	226	64	31
Gly	124	48	117
Ala	1681	1106	1017

表 2 40℃のお湯に浸漬した乾岩海苔の遊離アミノ酸組成 (mg/100g)

	3200 円	5300 円	6200 円
Tau	1531	1266	1135
Asp	310	96	95
Ser	166	49	126
AspNH ₂	70	64	35
Glu	508	209	229
GluNH ₂	280	67	55
Gly	135	68	122
Ala	1695	1124	1050

表 3 200℃で 5 分間焙焼した乾岩海苔の遊離アミノ酸組成 (mg/100g)

	3200 円	5300 円	6200 円
Tau	1655	1328	1339
Asp	317	89	79
Ser	181	37	124
AspNH ₂	76	63	27
Glu	422	167	244
GluNH ₂	98	58	42
Gly	125	30	121
Ala	1788	1326	1304

表 4 焙焼した乾岩海苔を 40℃のお湯に浸漬した試料の遊離アミノ酸組成 (mg/100g)

	3200 円	5300 円	6200 円
Tau	1652	1303	1366
Asp	315	85	88
Ser	176	38	126
AspNH ₂	78	66	35
Glu	417	166	243
GluNH ₂	103	49	
Gly	121	35	112
Ala	1755	1243	1273

② 乾岩海苔中の 5'-AMP と 5'-IMP の含有量

岩海苔中の 5'-AMP と 5'-IMP 含量を表 1 から 4 に、代表的なクロマトグラムを図 1 と 2 に示した。それぞれの試料において含有量にばらつきが認められるが、40℃のお湯に浸漬していない試料においては、5'-AMP が著量に含有されているが 5'-IMP 含量は低かった。40℃のお湯に浸漬した試料においては、5'-AMP は消失し、5'-IMP 含量が激増した。この結果は、岩海苔には、5'-AMP から 5'-IMP に変換する酵素 5'-AMP デアミナーゼ存在することを支持する。また、200℃で 5 分間焙焼した試料においてもこの結果が得られたことは、乾岩海苔中に存在する 5'-AMP デアミナーゼは、乾岩海苔中では、熱に対して極めて安定な酵素であることが裏付けられた。

表 1 乾岩海苔の核酸関連物質組成 (mg/100g)

	3200	5300	6200
5'-AMP	209	152	165
5'-IMP	38	+	52

表 2 40℃のお湯に浸漬した乾岩海苔の核酸関連物質組成 (mg/100g)

	3200	5300	6200
5'-AMP	0	0	0
5'-IMP	310	297	357

表 3 200℃で 5 分間焙焼した乾岩海苔の核酸関連物質の組成 (mg/100g)

	3200	5300	6200
5'-AMP	400	314	244
5'-IMP	40	46	21

表 4 焙焼した乾岩海苔を 40℃のお湯に浸漬した試料の核酸関連物質組成

	3200	5300	6200
5'-AMP	0	0	0
5'-IMP	391	311	343

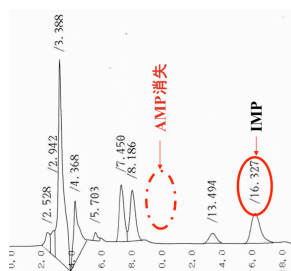


図 1 焙焼岩海苔の核酸関連物質のクロマトグラム

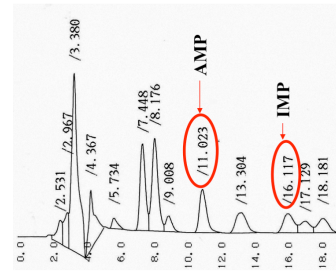


図 2 焙焼岩海苔を 40℃の蒸留水に浸漬した核酸関連物質のクロマトグラム

(2) 乾岩海苔中の 5'-AMP デアミナーゼの安定性の検討

(1)の結果と同様に、40℃の蒸留水に浸漬した試料については、いずれの時間においても 5'-AMP は 5'-IMP に完全に変換された。一方、70℃、100℃の蒸留水に浸漬した試料については、1 分後でも 5'-AMP デアミナーゼの活性は、消失した。このことは、水分を付与することにより酵素の安定性は著しく損なわれることが、判明した。

また、この結果は、焙焼した乾岩海苔に少量のお湯を加えて、かき混ぜて食べる伝統的な方法は、旨味成分である 5'-IMP の増加を促すと共に、著量に含まれる Glu とのうま味の相乗効果による、合理的な食べ方であることが証明された。

(3) 5'-AMP デアミナーゼの安定性の検討

図 1 に、粗酵素液に 5'-AMP を加え 25℃に 24 時間放置した後、HPLC において酵素活性を測定した結果を示した。

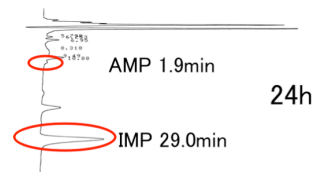


図 3 粗酵素液を 25℃に 24 時間放置した後の 5'-AMP デアミナーゼの酵素活性

この結果により 5'-AMP デアミナーゼは、25℃では、24 時間に多少酵素活性が消失するものの、5℃、25℃では安定で室温に置いて長期の保存が可能であると判明した。しかしながら、40℃では、酵素活性は 1 時間後には多少の消失が認められ、時間経過と共に AMP/IMP の比率が高くなり酵素活性が徐々に減少していくことが判明した。

なお、70℃、100℃では、5'-AMP デアミナーゼの酵素活性は、速やかに消失し、粗酵素の状態では熱安定性に劣る酵素であることが判明した。

ついで、2 価イオン (Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) の存在、非存在下における 5'-AMP デアミナーゼの酵素活性を 5℃の条件下において検討した。図 4、5 に Ca^{2+} の存在下、非存在下の 5'-AMP

デアミナーゼの酵素活性を示した。

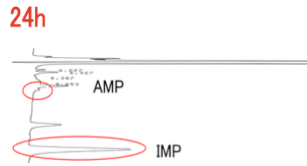


図4 Ca²⁺の存在下の5'-AMPデアミナーゼ酵素活性(24時間後)

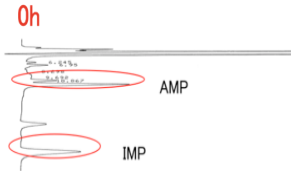


図5 Ca²⁺の非存在下の5'-AMPデアミナーゼ酵素活性(0時間後)

Ca²⁺の存在下では、AMP/IMP比率は24時間後でも3.9であり、5'-AMPデアミナーゼ酵素活性は、維持されていた。しかしながら、Ca²⁺非存在下では、AMP/IMP比率は0時間後でも86であり、5'-AMPデアミナーゼ酵素活性のほとんどが失われていた。また、Mg²⁺の存在下、非存在下においても同様な結果が得られた。

これらの結果により、5'-AMPデアミナーゼ酵素活性の発現、安定化には、Ca²⁺、Mg²⁺などの2価イオン必要であることが判明した。

(4) 5'-AMPデアミナーゼの単離・精製の検討

①限外ろ過
5'-AMPデアミナーゼ酵素活性は全て濃縮液に回収され、5'-AMPデアミナーゼの分子量は、10,000以上であることが推定された。

②ゲルろ過クロマトグラフィー

図1にゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示した。

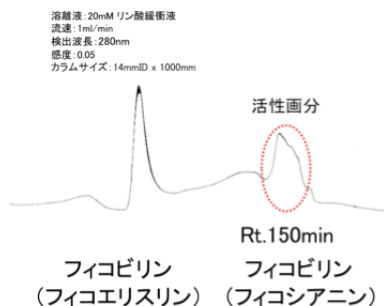


図1 ゲルろ過クロマトグラフィーのクロマトグラム

5'-AMPデアミナーゼ酵素活性は、リテンションタイム150min(フラクションNo.30)付近のピークに明瞭に認められたが、フィコエリスリンと思われる赤い色素と混在していた。活性が認められた画分を限外分子量が、

10,000の限外濾過膜を用いて濃縮し、SDS-PAGE電気泳動に付し、銀染色を行ったが、5'-AMPデアミナーゼのバンドは、存在量が少ないためか認められなかった。

また、溶媒フロント直後には、フィコシアニンと思われる赤い色素が溶出した。

③陰イオン交換クロマトグラフィー

活性は、溶媒フロントに認められ、フィコビリル色素とともに溶出した。陰イオン交換クロマトグラフィーは、5'-AMPデアミナーゼの単離・精製には有効な手段ではなかった。

④陽イオン交換クロマトグラフィー

陽イオン交換クロマトグラフィーの結果を図2に示した。

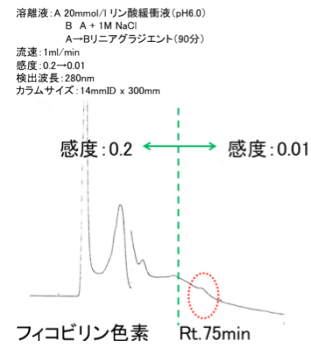


図2 陽イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラム

5'-AMPデアミナーゼ酵素活性は、リテンションタイム75min(フラクションNo.25)付近の小さなピークに明瞭に認められた。活性が認められた画分を限外分子量が、10,000の限外濾過膜を用いて濃縮し、SDS-PAGE電気泳動に付し、銀染色を行ったが、5'-AMPデアミナーゼのバンドは、存在量が少ないためか認められなかった。また、溶媒フロント直後には、フィコビリルと思われる赤い色素が2画分に溶出した。陽イオン交換クロマトグラフィーは、5'-AMPデアミナーゼの精製に有効な手段と考えられた。ゲルろ過クロマトグラフィーとの組合せせれば、5'-AMPデアミナーゼをある程度単離・精製できるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 昌弘 (MURAKAMI MASAHIRO)
共立女子大学・家政学部・教授
研究者番号: 70134517