

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580263

研究課題名(和文)循環型生物資源利用の立場から見たカツオ節加工残滓の利用に関する研究

研究課題名(英文)Effective utilization of dried bonito processing residue: Perspective from recycling-oriented biological resource use

研究代表者

任 惠峰 (Ren, Hui Feng)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：00345406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：カツオ節加工残滓の付加価値向上を図るため、それを異なる条件で処理し、タンパク質の回収率、アミノ酸、抗酸化性、抗変異原性を指標として処理方法の違いを比較した。

酵素分解法から機能性が高く、ペプチドを多く含む食素材が得られた。短所としてはタンパク質の回収率が低い(0.7～5%)。

酸加水分解法から遊離アミノ酸を中心とした食素材が得られた。タンパク質の回収率が高い(5～92%)が、機能性がやや低い。

研究成果の概要(英文)：In order to improve the added value of dried bonito processing residues, samples were treated with different conditions. The differences between treatment methods were compared according to the recovery rate of protein, the amount of amino acids, as well as the anti-oxidative activity and the anti-mutagenicity.(1) A large number of peptides and high functionality were obtained from the enzymatic degradation method, while the recovery of the protein was low (0.7-5%) as a disadvantage.(2) Free amino acids were mainly obtained from the acid hydrolysis method. The recovery rate of protein was high (5-92%), whereas the functionality was slightly lower.

研究分野：農学

キーワード：カツオ節 加工残滓 タンパク質 アミノ酸 抗酸化性 抗変異原性 酸加水分解 酵素分解

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に水産消費量の増加、水産資源の過度利用、自然災害や環境汚染などの影響で、食糧資源としての水産物はいずれ枯渇することが憂慮される。そのため、未利用資源の開発や有効利用、水産加工副産物の高度利用などを通じて、限られた生物資源を最大限利用することが求められる。

また、飽食の時代と呼ばれる今日、消費者の食品に対する要求はこれまでの一次機能の栄養性、二次機能の嗜好(呈味)性だけでなく、三次機能(抗酸化性、抗変異原性、血圧降下作用など)も注目されるようになってきた。そのため、食品加工残滓の高度利用の可能性およびその処理条件を検討する際には、処理費用などの経済性だけではなく、得られたものに上記の三つの機能性を持たせることができるかも合わせて考慮しなければならない。

水産加工残滓の一つとして、カツオ節加工残滓が挙げられる。カツオ節は日本の伝統的な食品素材であり、平成24年度のカツオの漁獲量は約28.9万トンで、カツオ節の生産量は約3.2万トンであった。カツオ節の加工工程は複雑で、その加工工程から多量の加工残滓が生じる。そのうち、削り粉は荒節を枯節に仕上げる工程において、荒節の表面を削る際に発生したもので、カツオ節の生産量から削り粉の発生量を計算すると、年間約400トンにのぼる。削り粉を水産系調味素材などとして再利用する際に、アルコール抽出法と熱水抽出法がよく使われている。しかし、前者では香氣成分を中心に、後者では一部の水溶性成分しか抽出できず、生じた二次残滓(以下、ボイル残滓と略す)は現在ほとんど低価格の飼・肥料への利用に留まっている。ボイル残滓自体は、ほとんど味が無いが、水不溶性タンパク質が豊富に残されているので、それを酵素又は塩酸で呈味性・機能性を有するアミノ酸や低分子ペプチドに分解できれば、呈味・機能性水産系調味素材として再利用することにより、ボイル残滓の利用価値を高くすることができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、カツオ節加工残滓から安全かつ、呈味・機能性を有する食素材を開発することを目的に、ボイル残滓を数種のタンパク質分解酵素および異なる濃度の塩酸で処理し、酵素分解試料および酸加水分解試料に含まれる呈味・栄養・機能性成分の含有量(18種遊離アミノ酸、全アミノ酸、ペプチド)、ボイル残滓に残存したタンパク質の回収率、抗酸化性、抗変異原性、変異原性の有無などを評価指標として、各処理条件を評価した。

3. 研究の方法

(1) 酵素分解試料の調製

ボイル残滓(以下試料と略す)を分析対象とした。供試酵素は調味料の呈味性の向上や、

エキス成分の回収率の向上などによく使われているタンパク質分解酵素のうち、天野エンザイム株式会社より提供されたプロテアックス(分解温度50℃、以下酵素Iと略す)、プロメラインF(分解温度50℃、以下酵素IIと略す)およびサモアーズPC10F(分解温度5℃、以下酵素IIIと略す)を用いた。酵素添加量を試料に含まれるタンパク質の1、2および4%に設定し、酵素分解時間を3、6、9、18時間に設定した。酵素分解した後、酵素分解液を遠心分離(15,000rpm、15分、10℃)し、得られた上澄みを酵素分解試料として供試するまで冷凍保存した。

(2) 酸加水分解試料の調製

分解温度を100℃、115℃に、塩酸濃度を1、2、3、4、5、6mol/Lに、分解時間を5、10、20hに設定し、試料を酸加水分解した。酸加水分解液を濾過し、濾過液に含まれる塩酸を完全に除去するまで減圧濃縮・乾固した後、蒸留水で定容したものを酸加水分析試料として供試まで冷凍保存した。

(3) 18種アミノ酸の分析

アミノ酸の測定は島津製LC-20AD液体クロマトグラフィを利用した。酵素分解試料の一部を脱脂・除タンパクした後、適宜に希釈し、18種遊離アミノ酸の分析に供試した。また、酵素分解試料の一部を酸加水分解(塩酸濃度:6mol/L、分解温度:115℃、分解時間:20時間)してから濾過し、濾過液に含まれる塩酸を完全に除去するまで減圧濃縮・乾固した後、蒸留水で定容したものを、更に適宜に希釈し、全アミノ酸の分析に供試した。定量分析は内部標準を用いない絶対検量線法を使用し、酵素分解試料または酸加水分解試料100mL当たりのアミノ酸含有量を算出した。酸加水分解試料を適宜に希釈し、全アミノ酸の分析に供試した。

(4) 抗酸化能の測定条件

酵素分解試料および酸加水分解試料をそのまま供試試料として用い、極微弱化学発光XYZ法により抗酸化性を測定した。活性酸素の一種である過酸化水素を対象とするXYZ法の測定はルミネッセンサーPSN(型式AB-2200CP)を用いた。抗酸化性標準物質は食品添加剤(酸化防止剤)として使われている没食子酸を用いた。没食子酸0.1mmolが示す抗酸化能の強さ(積分値)を1unitと定義し、それで同じ測定条件から得られた各試料の積分値を割って、分解液100mL当たりのunit数を算出し、抗酸化能の強さを評価した。

(5) 変異原性および抗変異原性の測定条件

酵素分解試料および酸加水分解試料をそのまま供試試料とし、変異原性および抗変異原性をウムラックAT-F(JIMURO株)により測定した。直接変異原物質フリルフラマイド(以下AF-2と略する)およびS9存在下で変

異原性を示す間接変異原物質 2-アミノアントラセン（以下 2-AA と略する）を既知変異原物質として用いた。

① 変異原性有無の判定

AF-2 の供試濃度を 0.3、0.1、0.033 $\mu\text{g/mL}$ に設定し、2-AA の供試濃度を 0.3、0.03、0.003 $\mu\text{g/mL}$ に設定した。また、希釈液をブランク試料として用いた。試料の吸光度はブランク試料の 1.5 倍以上が擬陽性で、ブランク試料の 2 倍以上が陽性とした。

② 抗変異原性の評価

以下の式より試料の抗変異原性の強さを評価した。

変異原性抑制率 (%) = $[(A-B)/A] \times 100\%$
 A=変異原物質 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ AF-2 または 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 2-AA) と希釈液を添加した場合の平均吸光値

B=変異原物質 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ AF-2 または 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 2-AA) と試料を添加した場合の平均吸光値

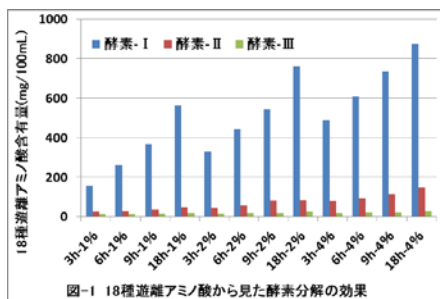
4. 研究成果

(1) 呈味成分・機能性成分・タンパク質の回収率に及ぼす酵素分解条件の影響

1) アミノ酸組成から見た酵素分解の効果

① 18 種遊離アミノ酸から見た酵素分解の効果

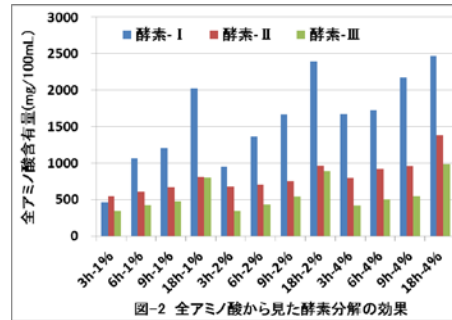
酵素分解試料から検出した 18 種遊離アミノ酸の合計量を図-1 に示した。18 種遊離アミノ酸を、酵素 I で処理した試料から 155~874mg/100mL、酵素 II で処理した試料から 25~148mg/100mL、酵素 III で処理した試料から 13~29mg/100mL 検出した。分解効果をもっとも高かった酵素 I の試料について、酵素添加量および処理時間の影響をみると、図-1 に示した通り、酵素 I を 1% 添加した試料から 155~562 mg/100mL、2% 添加した試料から 329~759 mg/100mL、4% 添加した試料から 490~874 mg/100mL 検出した。しかし、3 時間で処理した試料を除けば、酵素添加量を 1% から 4% まで増加しても、相応した遊離アミノ酸の増加倍率が見られなかった。



② 全アミノ酸から見た酵素分解の効果

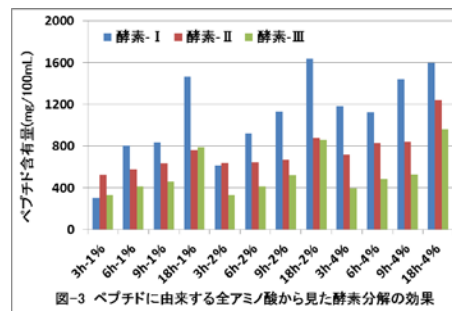
酵素分解試料から検出した全アミノ酸の含有量を図-2 に示した。全アミノ酸を、酵素 I で処理した試料から 459~2470mg/100mL、酵素 II で処理した試料から 547~1384mg/100mL、

酵素 III で処理した試料から 342~986 mg/100mL 検出した。18 種遊離アミノ酸と同じく、分解効果をもっとも高かった酵素 I の試料について、酵素添加量および処理時間の影響をみると、図-2 に示した通り、酵素 I を 1% 添加した試料から 459~2024mg/100mL、2% 添加した試料から 944~2396mg/100mL、4% 添加した試料から 1672~2470mg/100mL 検出した。しかし、3 時間で処理した試料を除けば、酵素添加量を 1% から 4% まで増加しても、相応した遊離アミノ酸の増加倍率が見られなかった。



③ ペプチドに由来するアミノ酸の占める割合から見た酵素分解の効果

酵素分解試料に含まれる全アミノ酸から 18 種遊離アミノ酸を差し引いて得られた結果を図-3 に示した。ペプチドに由来するアミノ酸を、酵素 I で処理した試料から 304~1637mg/100mL、酵素 II で処理した試料から 522~1236mg/100mL、酵素 III で処理した試料から 329~958mg/100mL 検出した。酵素 I で分解した試料を除けば、酵素 II および酵素 III で分解した試料に含まれる全アミノ酸の 88% 以上がペプチドに由来するものであった。



④ 主な呈味・機能性を有するアミノ酸含有量から見た酵素分解の効果

全アミノ酸のうち、Asp、Glu、Pro、Gly、Ala、Leu、Lys の 7 種が最も多く検出された。これら 7 種の合計量を、酵素 I で処理した試料から 302~1589mg/100mL、酵素 II で処理した試料から 381~931mg/100mL、酵素 III で処理した試料から 229~664mg/100mL 検出した。いずれの酵素に関しても、酵素分解条件の変化に伴って、これら 7 種アミノ酸含有量の増加傾向が見られたが、酵素 I で分解した試料を除けば、いずれもほぼペプチドに由来するもの

であった。

2) 機能性からみた酵素分解の効果

① 抗酸化能からみた酵素分解の効果

酵素分解試料の抗酸化能を図-4に示した。抗酸化能の消長に及ぼす酵素使用量および分解時間の影響についてみると、酵素Iで処理した試料から9-36 units/100mL、酵素IIで処理した試料から6-23 units/100mL、酵素IIIで処理した試料から7-15 units/100mL 検出した。そのうち、酵素Iで処理した試料の抗酸化能が最も高く、処理時間および酵素使用量の増加に伴って、抗酸化力が有意に高くなった。

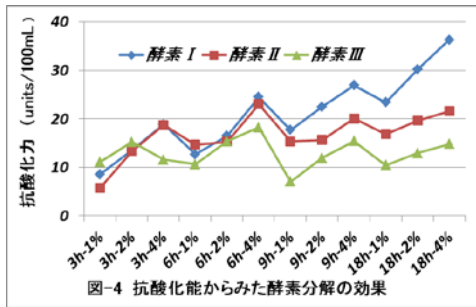


図-4 抗酸化能からみた酵素分解の効果

② 抗変異原性からみた酵素分解の効果

既知変異原物質 AF-2 および 2-AA に対する抑制率を図-5 および図-6 に示した。まず、AF-2 に対する抑制率の消長に及ぼす酵素使用量および分解時間の影響についてみると、AF-2 に対する抑制率を、酵素Iで処理した試料から13~32%、酵素IIで処理した試料から6~29%、酵素IIIで処理した試料から4~20%検出した。そのうち、酵素Iで処理した試料の抑制率が最も高かった。また、いずれの酵素処理についても、処理時間が同じ場合、酵素使用量の増加に伴って、AF-2 に対する抑制率が高くなる傾向が見られた。

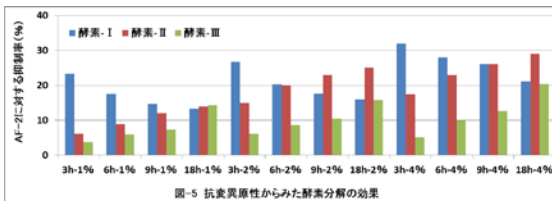


図-5 抗変異原性からみた酵素分解の効果

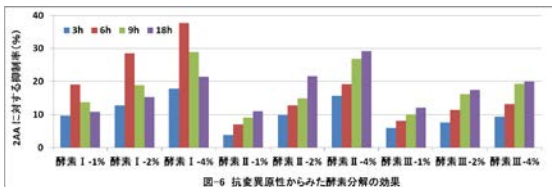


図-6 抗変異原性からみた酵素分解の効果

続いて、2AA に対する抑制率の消長に及ぼす酵素使用量および分解時間の影響についてみると、2AA に対する抑制率を、酵素Iで処理した試料から11~38%、酵素IIで処理した試料から4~29%、酵素IIIで処理した試料から6~20%検出した。酵素Iで処理した試料の抑制率が最も高かった。また、いずれの酵素においても、処理時間が同じ場合、酵素使用量の増加に伴って、AF-2 に対する抑制率が

高くなる傾向が見られた。

(2) 呈味・機能性成分およびタンパク質の回収率に及ぼす酸加水分解条件の影響

1) 全アミノ酸含有量およびタンパク質の回収率から見た酸加水分解条件の影響

まず、酸加水分解試料に含まれる全アミノ酸の合計量を図-7に示した。1~6mol/L 塩酸で分解した試料を、分解時間5、10、20時間の順で見ると、100℃で分解した各試料から全アミノ酸を2~27 g/100mL、6~31 g/100mL、11~37 g/100mL 検出した。これに対して、115℃で分解した試料から全アミノ酸を15~34 g/100mL、24~38 g/100mL、28~42 g/100mL 検出した。いずれの分解温度においても、処理時間および塩酸濃度の増加に伴って、全アミノ酸の含有量も高くなる傾向が見られた。処理時間および塩酸濃度が同じ場合、115℃で処理した試料の全アミノ酸の含有量が100℃で処理した試料のそれより高かった。カツオ節加工残渣に残存したタンパク質含有量(46 g/100 g)および各酸加水分解試料に含まれる全アミノ酸含有量から算出したタンパク質の回収率を見ると、図-8に示したように、分解温度が100℃の場合は5%~80%で、分解温度が115℃の場合は34~92%であった。いずれも処理時間および塩酸濃度の増加に伴って、タンパク質の回収率も著しく増加したが、115℃、20時間、6mol/L 塩酸で処理した試料が一番高かった。

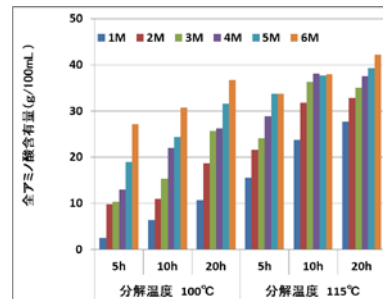


図-7 全アミノ酸含有量から見た酸加水分解条件の影響

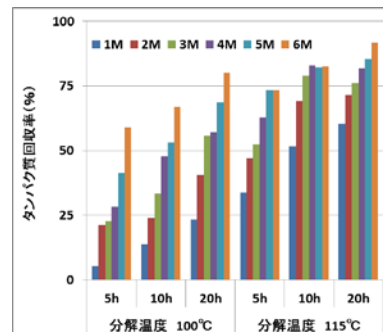


図-8 タンパク質の回収率から見た酸加水分解条件の影響

2) アミノ酸組成から見た酸加水分解条件の影響

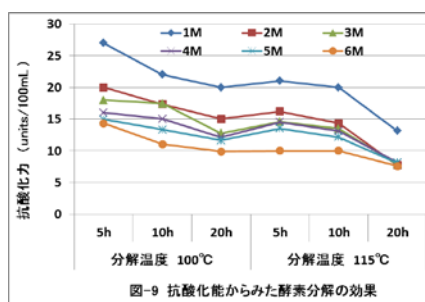
全アミノ酸のうち、Asp、Glu、Gly、Ala、Leu、Lys、Argの7種が多く検出された。検出されたこれら7種アミノ酸含有量を、分解時間5、

10、20 時間の順でみると、100℃の場合は 1～18 g /100mL、3～20 g /100mL、7～24 g /100mL、115℃の場合は 10～22 g /100mL で、16～23 g /100mL、20～26 g /100mL であった。いずれも 6mol/L 塩酸で処理した試料のアミノ酸含有量が一番多かった。

3) 機能性から見た酸加水分解条件の影響

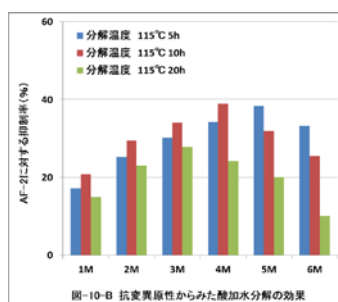
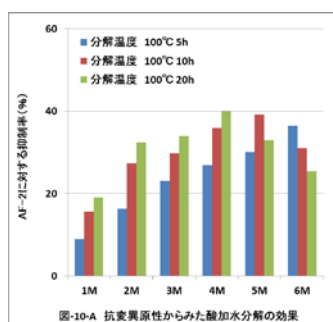
① 抗酸化力からみた酸加水分解の効果

酸加水分解試料の活性酸素 (H_2O_2) に対する抗酸化力を図 9 に示した。抗酸化力を、分解時間 5、10、20 時間の順で並べて比較すると、100℃で分解した試料から、27～14 units/100mL、22～11units/100mL、20～10units/100mL を検出した。これに対して 115℃で分解した試料から 21～10units/100mL、20～10units/100mL、13～8 units/100mL を検出した。いずれも酸加水分解条件が強くなるにつれて、抗酸化力が減少する傾向が見られた。



② 変異原性および抗変異原性から見た酸加水分解条件の影響

いずれの供試試料からも変異原性が検出されなかった。これに対して、図-10-A および図-10-B に示したように、直接変異原物質 AF-2 に対する抑制率を 9-40% 検出したが、間接変異原物質 2-AA に対する抑制率が検出されなかった。



AF-2 に対する抑制率を、分解温度、分解時間および塩酸濃度についてみると、【115℃の 5 時間・5MHC1】、【115℃の 10 時間・5MHC1】および【115℃の 10 時間・6MHC1】の 3 検体を除けば、150℃、5 時間および 10 時間で処理した試料の抗変異原性が、100℃の 5 時間および 10 時間で処理した試料の抗変異原性より高かった。これに対して 100℃、20 時間で処理した試料の抗変異原性が 115℃、20 時間で処理した試料のそれより高かった。

本研究では、カツオ節加工残滓から呈味・機能性食素材の開発を目的に、ボイル残滓を異なる酵素分解条件および酸加水分解条件で処理した。得られた試料に含まれる 18 種遊離アミノ酸、全アミノ酸、タンパク質の回収率、抗酸化性、抗変異原性、変異原性を比較しながら、水不溶性タンパク質を含むボイル残滓から有用成分を抽出するための最適条件を検討した。得られた結果から以下のことが分かった。

① 供試した 3 種のタンパク質分解酵素のうち、酵素 I (プロテアックス) の分解効果が最も高く、18 種遊離アミノ酸を 155-874 mg/100mL、全アミノ酸を 459-2470 mg/100mL、過酸化水素に対する抑制率を 9-36 units/100mL、直接抗変異原性を 13-32%、間接抗変異原性を 11-38% 検出した。全アミノ酸のうち、呈味性・機能性を有する Asp、Glu、Pro、Gly、Ala、Leu、Lys の 7 種が最も多く含まれているが、ペプチドに由来するものが多かった。

このように、酵素分解法で処理する場合、タンパク質が遊離アミノ酸よりもペプチドに分解される傾向が高かった。ただし、供試したボイル残滓に残留した水不溶性タンパク質はガラス化などの変化を受けたため、酵素処理能力の限界が見られ、分解効果が最も高いものでも、タンパク質の回収率がわずか 5% しかなかった。分解効果が最も高い酵素 I で処理した試料から検出した抗酸化力および抗変異原性の結果から、酵素分解液を濃縮すれば、機能性食素材として用いられると考えられる。しかし、酵素の市販価格および酵素分解液を濃縮する際に必要とするエネルギーなどのコスト面も総合的に考慮すると、今回検討した酵素処理条件から最適処理条件を決めるには難しいと思われる。

② 酸加水分解試料から全アミノ酸を 2～42g/100mL、過酸化水素に対する抑制率を 8-27 units/100mL、直接抗変異原性を 9-40% 検出し、懸念される変異原性が全く検出されなかった。全アミノ酸のうち、Asp、Glu、Gly、Ala、Leu、Lys、Arg の 7 種が最も多く含まれている。

このように、酸加水分解法は酵素分解法と違って、ガラス化などの変化を受けた水不溶性タンパク質に対しても、強い分解力を持って

いる。そのため、タンパク質がペプチドよりも遊離アミノ酸に分解される傾向が高かった。塩酸濃度、分解温度および分解時間の増加に伴って、タンパク質の回収率が著しく増加し、最大で 92%程度回収できた。ただし、タンパク質の回収率が高いほど、機能性を持つペプチドがほぼ遊離アミノ酸に分解されたため、抗酸化性および抗変異原性が低くなる傾向が見られた。実際の必要に応じて分解条件を調整すれば、異なるタイプの食素材が得られる。つまり、タンパク質の回収率を重視し、遊離アミノ酸液が得たい場合は、もっとも強い分解条件を使用した方がよいと思われる。呈味性と機能性のバランスを取れた食素材を重視する場合は、塩酸濃度および分解時間をある程度下げた方がよいと思われる。

③ 以上、本研究の分析結果からこれまで飼・肥料として使われているカツオ節加工残滓から機能性天然食素材を得られる可能性があることを確認できた。酵素分解処理法および酸加水分解法から得られた試料にはそれぞれの特徴があるが、タンパク質の回収率、呈味・機能性成分の含有量、安全性および機能性の強さから総合的に考慮すると、酸加水分解法が効果的な処理方法だと考えられる。

5. 主な発表論文等 〔学会発表〕(計 6 件)

1) [○]LinLyu CHEN、Huifen REN AND Hideaki ENDO
The Utilization of Dried Bonito Stick ProcessinmL Residue
CAN 2015 12th Asian ConmLress of Nutrition、
2015 年 5 月 15 日
Yokohama Pacifico Japan.

2) [○]任 惠峰・岡田美緒・遠藤英明
アミノ酸含有量および抗酸化性に及ぼす酸加水分解条件の影響
平成 27 年度日本水産学会春季大会
2015 年 3 月 28 日
東京 海洋大学品川キャンパス.

3) [○]陳 玲玉・遠藤英明・任 惠峰
血圧降下作用に及ぼす酵素分解条件の影響
日本食品科学工学会第 61 回大会
2014 年 8 月 29 日
福岡 中村学園大学.

4) 陳 玲玉・山内 史明・志方 昌美・岡田美緒・日比香子・遠藤英明・[○]任 惠峰
低分子ペプチド含有率および抗酸化能に及ぼす酵素分解条件の影響
平成 26 年度日本水産学会春季大会
2013 年 3 月 30 日
北海道大学函館キャンパス.

5) 陳 玲玉・[○]任 惠峰・岡田美緒・遠藤英明

抗酸化力に及ぼす酵素分解条件の影響
平成 25 年度日本水産学会春季大会
2013 年 3 月 26 日
東京 東京海洋大学.

6) [○]任 惠峰・陳 玲玉・趙 珊珊・遠藤英明
18 種アミノ酸含有量に及ぼす酵素分解条件の影響
平成 24 年度日本水産学会秋季大会
2012 年 9 月 14 日
下関市 水産大学校.

6. 研究組織

(1) 研究代表者
任 惠峰 (REN HUIFENG)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授
研究者番号：00345406