ノート

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol. 65, No. 8, pp. 1229~1231, 1991]

グルタルアルデヒドを用いたアミノ基
定量による魚肉酵素分解反応の
簡易モニタリング法

受田浩之, 松本 清

甲木 功, 箆島 豊

(九州大学農学部食糧化学工学科)

平成 3 年 2 月 7 日 受理

A Simple Method for Monitoring the
Enzymatic Hydrolysis of Fish Meat :
Determination of Amino Groups
Using Glutaraldehyde

Hiroyuki UKEDA, Kiyoshi MATSUMOTO,

Isao KATSUKI and Yutaka OSAJIMA

Department of Food Science and Technology,

Faculty of Agriculture, Kyushu University,

Fukuoka 812

The enzymatic hydrolysis reaction of fish meat was monitored by an amino group determination method with glutaraldehyde (GA). The method was based on the consumption of dissolved oxygen during the reaction between glutaraldehyde and amino groups. The oxygen consumption for 3 min was measured with a Clark-type oxygen electrode. Sardine meat was hydrolyzed with protease denzyme AP, and the amino group of the hydrolyzate was determined by the GA method. The results by GA method were in agreement with the trinitrobenzenesulfonic acid method (correlation coefficient $r=0.992$), suggesting that the GA method was applicable in monitoring the hydrolysis reaction of fish meat. (Received February 7, 1991)

魚肉の酵素分解反応で得られる分解液は特有の風味を有する調味料として広く用いられているが、近年その分解液中に優れた生理機能、たとえばアンジオテンシン I 転換酵素阻害活性を有するペプチドの存在が報告され、そのスクリーニングが盛んに行われている⁽¹⁻³⁾。これらの研究、さらに高い生理機能を付与した食品としての魚

肉エキスの製造においては、従来までの調味料としてのエキス製造よりも厳密な酵素分解反応の制御が必要とされる。

従来の魚肉エキス製造の工程管理には主に屈折計を利用した可溶性固形分含量の指標として、果汁等の糖度の簡易指標に用いられている Brix (%) 表示が代用されている。しかしながら、魚肉の酵素分解反応には、分解に伴うペプチド画分の可溶化と可溶化したペプチドがさらに分解を受け、低分子化する 2 つの反応過程の存在が考えられる。分解液の可溶性固形分含量の代用としての Brix (%) 値あるいは窒素含量は、前者の反応の指標としては適用可能であるが、後者の反応に関しての知見は有しておらず、厳密にその構造を規定されたペプチドの製造管理には不適切である。生化学的な蛋白質分解酵素の反応のモニタリングには、分解液に存在してくるペプチドの一级アミノ基を定量する TNBS (trinitrobenzenesulfonic acid) 法⁽⁴⁾が一般に用いられており⁽⁵⁾、Adler-Nissen⁽⁶⁾ はその TNBS 法を一部改良して食品蛋白質の加水分解度の測定に適用した。しかしながら、TNBS 法は反応に 2 時間程度を要することから、魚肉加水分解工程のモニタリング法としては本質的に馴じみえない。

一方、著者らはこれまでにグルタルアルデヒド (GA) を用いた溶存酸素消費量の測定に基づくアミノ基定量法^(7,8)を報告している。本報ではこの GA 法を魚肉加水分解工程のモニタリングに適用することを目的として検討するとともに、TNBS 法との比較を行った。

クラーク型酸素電極は Yellow Springs Instrument 社製 model No. 5331 を用い、測定は -0.8 V で行った。GA 法によるアミノ基の定量は既報⁽⁷⁾に従い、以下の方法で行った。酸素電極用測定セルにビタミン K_3 を飽和 (20°C において 0.55 mM) させた 0.2 M リン酸塩緩衝液 ($\text{pH } 8.2$) を 2 ml 添加した。酸素電極の示す電流値が一定となった後、 5% GA 溶液 (Taab Laboratories Equipment 社製 70% 水溶液を 1 mM 塩酸で希釈した) $200\text{ }\mu\text{l}$ と試料溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ を注入し、電流応答曲線から試料注入 3 分後の電流減少値を求めた。検量線作成には L-グリシンを用い、試料のアミノ基量を L-グリシンに相当するアミノ基量として算出した。なお、測定はすべて 20°C で行った。

イワシすり身 50 g または 250 g におのおの 500 ml の脱イオン水を加え、2 分間ホモジナイズし、これにデ

ナチーム AP (ナガセ生化学工業製) 450 mg を加えて 40°C において振盪下で酵素分解を行った。一定時間経過後、分解液を 98°C で 15 分間加熱し酵素を失活させ、遠心分離、濾過操作を行い試料溶液とした。すり身 250 g から得られた酵素分解液は脱イオン水で 2 倍に希釈した後、試料溶液とした。

牛血清アルブミンの酵素分解は以下の手順で行った。2% 牛血清アルブミン (BSA: ナカライトスク製) 25 ml にデナチーム AP を 20 mg 添加し、40°C にて振盪下で反応させた。一定時間の分解反応後、分解液をそのまま試料溶液として分析に供した。

TNBS (和光純薬工業製) によるアミノ基の定量は Satake らの方法⁽⁴⁾に従った。L-グリシンに対する検量線より試料中のアミノ基量を算出した。窒素含量の測定は九州大学中央分析センター所属の CHN 元素分析計 (日立製 026 型) を、また可溶性固形分の測定にはアタゴ製手持屈折計 N タイプを用いた。

Fig. 1 にイワシすり身 50 g, および 250 g の酵素分解反応過程でのアミノ基量の変化を GA 法により測定した結果を示した。ここで反応時間 0 の試料は、加水した魚肉ホモジネートをあらかじめ 98°C に加熱し、これに酵素を添加してさらに 15 分加熱することにより調製した。5 時間の酵素分解反応により、A (50 g すり身) では 3.2 倍、B (250 g すり身) では 4.6 倍のアミノ基量の増加が認められた。

Fig. 1 に示した試料のアミノ基量を生化学的分野で常用されている TNBS 法により測定し、GA 法で得られ

Fig. 1. Time Course of Enzymatic Hydrolysis Reaction of Fish Meat Monitored by GA Method. Sardine meat (A; 50 g, B; 250 g) was hydrolyzed in 500 ml of water.

た値と比較した (Fig. 2). 両者の間の相関係数は 0.992 であり、高い相関関係が認められた。回帰式は $y = 0.3 + 0.93x$ (x : GA 法での値, y : TNBS 法での値) であり、全体として GA 法で得られた値が TNBS 法での値よりいくぶん高くなる傾向が認められた。両者の方法共に検量線には L-グリシンを用い、試料中のアミノ基量をグリシン相当量として算出したが、TNBS 法ではモノアミノ酸に対する色素体のモル吸光係数がペプチドのモル吸光係数よりも大きくなるために⁽⁴⁾, このような差が認められたものと考えられた。この結果、GA 法はイワシすり身の酵素分解反応で生じるペプチドのアミノ基定量に十分な適用性を有していることが明らかとなった。

従来、魚肉蛋白質の分解反応の指標として用いられて

Fig. 2. Comparison between Amino Group Concentration Determined by TNBS Method (Ordinate) and by GA Method (Abcissa)

Fig. 3. Change in Amino Group Concentration, Nitrogen Content and Brix during Enzymatic Hydrolysis of BSA. Amino group was determined by GA method.

きた窒素含量および可溶性固形分含量の代用としての Brix (%) 表示値はともに、蛋白質から酵素作用により溶液中に可溶化してきたペプチド含量とは相関があるものと考えられるが、実際には可溶化したペプチドは酵素の作用によりさらに低分子のペプチドへ加水分解される。したがって、可溶化した一分子のペプチドから新たに複数個のペプチドまたはアミノ酸が生成する反応過程をこれらの分析値から追跡することは困難であると考えられる。

Fig. 3 はこのような可溶性の画分が酵素分解を受け、低分子のペプチドに分解されていく過程を BSA をモデルとして、GA 法により測定した結果である。同様にして一定時間ごとにこの分解液の窒素含量および可溶性固形分含量の代用としての Brix (%) 値を測定したところ、両者の値はほぼ一定の値を示し、反応時間に対する依存性を示さなかった。この結果は GA 法が従来の窒素含量、可溶性固形分含量の代用としての Brix (%) 値からでは検出することができない可溶化した画分の分解過程を十分にモニタリングすることを示唆するものであった。

GA 法はクラーク型酸素電極を検出器として使用するために、食品のような着色、懸濁した試料に対しても何ら妨害を受けず、さらに測定に要する時間が約 3 分間であることから、今後機能性食品の製造を含めた正確な反応制御が要求される酵素分解反応プロセスの工程管理に有用であると考えられる。

- (1) 末綱邦男, 饒島克裕: 日水誌, **52**, 1981 (1986).
- (2) K. Suetsuna, M. Yamagami and K. Kuwata: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1853 (1988).
- (3) 末綱邦男, 饒島克裕: 栄食誌, **42**, 47 (1989).
- (4) K. Satake, T. Okuyama, M. Ohashi and T. Shinoda: *J. Biochem.*, **47**, 654 (1960).
- (5) G. L. Chong, L. C. Davis and G. R. Reeck: *Anal. Biochem.*, **186**, 269 (1990).
- (6) J. Adler-Nissen: *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1256 (1979).
- (7) H. Ukeda, E. Miyazaki, K. Matsumoto and Y. Osajima: *Anal. Chem.*, **58**, 2975 (1986).
- (8) H. Ukeda, S. Tanaka, K. Matsumoto and Y. Osajima: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2835 (1987).