

植物性食品抽出物による南極産オキアミ プロテアーゼ活性の阻害†

中 川 禎 人・前 重 静 彦

Inhibition of Protease Activity in Antarctic Krill (*Euphausia superba*) by Aqueous Extract of Plant Foods

Sadato NAKAGAWA and Shizuhiko MAESHIGE

For control of aging of salted and fermented Antarctic krill, i.e., *okiami-no-shiokara*, inhibitory effect of the extracts from 24 edible plants on the protease activity in Antarctic krill was studied. The inhibitory effect on the activity of crude enzyme from raw krill (assayed by the casein-275nm absorption method) was in order of lotus>leek>garlic $\approx$ burdock>tomato>potato $\approx$ cabbage. The specific inhibitory effect was in order of parsley>tomato>leek $\approx$ lotus>burdock>cabbage>Japanese radish>Japanese eggplant. The inhibitory effect of *Leguminosae* plant extracts could not be estimated owing to turbidity of the filtrates. The krill protease activity was found to be significantly inhibited by the extracts of potato, Japanese eggplant, carrot, soybean, kidney bean, adzuki bean, and sweet potato, on the basis of the amino acid nitrogen amount liberated from the *okiami-no-shiokara* in the course of the aging.

南極産オキアミを有姿のままで食品加工に利用する際の適正加工条件を求めるため、今まで、塩辛の熟成に及ぼす食塩や添加物などの影響¹⁾ および加熱調味によるトリメチルアミノオキサライドの分解²⁾ について検討してきた。生凍結オキアミを有姿のままで利用する場合、内在するプロテアーゼによって急速に体タンパク質が分解し、身崩れを起こすことが指摘されていた³⁾。実際に、著者ら¹⁾ が塩辛への利用試験を行った際に、熟成が進むとオキアミが身崩れを起こし、殻が残る状態になった。この状態では塩辛としての商品価値がないと思われる。熟成の制御は食塩の添加濃度を高めることによって可能であった¹⁾ が、食品の低塩化志向を考慮すると得策ではない。

植物性食品のプロテアーゼ阻害については、例えば、成書⁴⁾、総説⁵⁾ および報文⁶⁾ 等に述べられているように多くの報告がある。そこで、本研究では、比較的簡易に使用でき、しかも、安全性の高い天然インヒビターを用いて塩辛の熟成を制御するため、植物性食品の抽出物によるオキアミプロテアーゼ活性の阻害について検討した。

実 験 方 法

1. 原材料

(1) 供試オキアミ

南極海域で捕獲後、船上で生凍結されたオキアミ (*Euphausia superba*) を用いた。なお、オキアミを入手後は-30℃で貯蔵し、適宜試験に供した。

(2) 供試植物

次の市販品24種を用いた。キュウリ、ニホンカボチャ（ウリ科）；ゴボウ、レタス（キク科）；ハス（レンコン）（ヒツジグサ科）；ショウガ（ショウガ科）；ニラ、ニンニク、タマネギ、ネギ（ユリ科）；カンラン、ダイコン（アブラナ科）；トマト、パレイショ、ピーマン、ナス（ナス科）；セロリ、ニンジン、パセリ（セリ科）；ダイズ、サイトウ（ウズラ）、アズキ、ツユマメ（マメ科）；サツマイモ（ヒルガオ科）

2. 試料の調製

(1) オキアミ粗酵素液

凍結オキアミに5倍量の0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)

†南極産オキアミの利用加工に関する研究（第3報）

Studies on Processing of Antarctic Krill (*Euphausia superba*) (Part 3)

前報：文献2）参照

を加えて、試料容器の周囲を氷冷しながらホモジナイザーで均質化した後、5℃、13,000rpmで30分間遠心分離して得られた上澄を粗酵素原液とした。この原液を-30℃で保管した。活性阻害試験には、原液を室温に戻した後、0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)で10倍に希釈したものを用いた。

(2) 植物抽出液

マメ科のダイズ、サイトウ、アズキ以外の場合には、等量の水と混合して家庭用ミキサーで粉碎し、ガーゼでろ過後、5,000rpmで20分間遠心分離して得られた上澄を植物抽出液とした。ダイズ、サイトウ、アズキの場合には、4倍量の水で一夜吸水膨潤させた後、浸漬水と豆をミキサーに入れ粉碎した。さらに4倍量の水を加えてガーゼろ過、遠心分離して得られた上澄を植物抽出液とした。抽出液は活性阻害試験に供するまで-30℃で保管した。

(3) 植物抽出液添加のオキアミ塩辛

凍結オキアミ100g、植物抽出液25g、塩化ナトリウム12.5g、0.2%抗生物質(塩酸テトラサイクリンとトリアセチルオレアンドマイシンを2:1の比率で配合した複合剤)水溶液3.5ml(終濃度50ppm)を混合し、オキアミの凍結ブロックをほぐした後、ホモジナイザーで均質化した。これをポリエチレン袋に入れて密封し、30℃の恒温器中に貯蔵した。貯蔵中、毎日1回攪拌した。なお、抗生物質の添加は、貯蔵中のバクテリアの発育を阻止するためであって、塩辛への添加は許可されていない。

3. 試料の性状分析

(1) 植物抽出液のオキアミプロテアーゼ活性阻害能

プロテアーゼ活性はカゼイン-275nm吸収法⁷⁾によって測定した。すなわち、2.5%カゼイン溶液を基質、0.66M三塩化酢酸溶液(以後、TCAと略記)を反応停止液として下記の6種の反応を行い、これらのろ液の275nmにおける吸光度から次式によって阻害率を求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{A - \{B - (C_1 - C_0)\}}{T_0 - T} \times 100$$

A (阻害試験対照区)

粗酵素液(1ml) + 水(2ml) + カゼイン溶液(2ml) → 30℃, 60分 → + TCA(3ml) + 植物抽出液(2ml) → 30℃, 30分 → ろ液

B (阻害試験区)

粗酵素液(1ml) + 植物抽出液(2ml) + カゼイン溶液(2ml) → 30℃, 60分 → + TCA(3ml) + 水(2ml) → 30℃, 30分 → ろ液

C₁ (抽出液と緩衝液の反応区)

粗酵素液(1ml) + 植物抽出液(2ml) + 0.05M トリス-塩酸緩衝液(2ml) → 30℃, 60分 → + TCA(3ml) + 水(2ml) → 30℃, 30分 → ろ液

C₀ (抽出液、緩衝液および反応停止液の反応区)

粗酵素液(1ml) + 植物抽出液(2ml) + 0.05M

トリス-塩酸緩衝液(2ml) + TCA(3ml) + 水(2ml) → 30℃, 30分 → ろ液

T₀ (抽出液を含まない反応区)

粗酵素液(1ml) + 水(2ml) + カゼイン溶液(2ml) → 30℃, 60分 → + TCA(3ml) + 水(2ml) → 30℃, 30分 → ろ液

T (抽出液を含まない反応停止区)

粗酵素液(1ml) + 水(4ml) + TCA(3ml) + カゼイン溶液(2ml) → 30℃, 30分 → ろ液

ここで、吸光度BからC₁-C₀の値を引いたのは、植物抽出液中の成分とカゼイン溶媒である0.05Mトリス-塩酸緩衝液およびTCAとの反応による着色および275nmにおける吸光度変化の影響を消去するためである。

(2) オキアミ塩辛のアミノ態窒素

オキアミ塩辛5gに20%TCA20mlを加えた後、水で全容を100mlとした。このろ液の一部についてホルモール滴定法により測定した。

(3) 植物抽出液中のエキス量

同心円状に巻いたろ紙を入れて恒量まで乾燥した蒸発皿に抽出液5mlを取り、105℃で恒量まで乾燥した。この時の残渣をエキスとし、抽出液100ml中のエキス量として表した。

4. 比阻害率の計算

阻害活性試験には植物抽出液2mlを供した。この時に得られた阻害率を、エキス1gあたりに換算して比阻害率とした。

実験結果および考察

1. カゼインを基質とした場合のオキアミプロテアーゼ活性を阻害する植物の検索

24種の植物から得られた水抽出液のオキアミ粗酵素に対する阻害活性、抽出液中のエキス量およびエキス1gあたりに換算した比阻害率を表1に示した。ハス>パセリ>ニラ>ニンニク>ゴボウ>トマト>パレイショ>カンランの順に強い阻害活性が認められた。比阻害率の大きさは、パセリ>トマト>ニラ>ハス>ゴボウ>カンラン>ダイコン>ナスの順であった。阻害率にマイナス符号が付く場合は活性を促進することを意味する。ピーマン、セロリ、ニンジン、ニホンカボチャ、キュウリなどに活性促進作用が認められた。マメ科植物に阻害物質が存在していることはすでに多く報告されている⁴⁾が、この実験に用いた阻害活性測定法では、反応後のろ液混濁のため測定不能であった。

2. オキアミ塩辛の熟成を阻害する植物の検索

植物抽出液を添加した塩辛の貯蔵中におけるアミノ態窒素生成量の変化を図1に示した。アミノ態窒素生成量を基準に、植物抽出液の阻害性を判定した。貯蔵7日後

の試料のアミノ態窒素生成量から各植物抽出液の阻害率をみると、バレイショ、ナス、ニンジン、ダイズ、サイトウ、アズキ、サツマイモ等に阻害活性が認められた。中でも、バレイショ、サツマイモ、ダイズ、アズキおよびサイトウの阻害活性が強かった。これらほどではないが、ニンニク、タマネギ、ネギなどに阻害活性が認められた。これらの植物抽出液を添加した試料のアミノ態窒素生成阻害曲線を見ると、植物抽出液には、2通りの阻害形式が存在するものと考えられる。すなわち、抽出液無添加区（対照区）と比べて、アミノ態窒素の生成速度が小さく、かつ平衡に達したときの生成量が少ない型（バレイショ、サツマイモ、ダイズの場合に相当）と、

平衡に達するまでの期間の生成速度が小さくなるだけで、平衡に達したときの生成量が対照区と同じ型（ナス、ニンジン、サイトウ、アズキの場合に相当）である。

表1と図1を照合すると、オキアミから抽出した粗酵素に対する植物抽出液の阻害活性と、オキアミ塩辛に添加した場合の阻害活性が一致しないものがある。これは、粗酵素についての阻害活性をカゼイン基質で測定していることが原因の一つと考えられる。天然阻害物質の検索には、基質の適否およびより迅速で簡単な測定法の検討が必要である。また、阻害物質の実用性を高めるためには、精製、単離技術の確立も必要である。

表1 オキアミプロテアーゼ活性に対する植物抽出液の影響

植物抽出液の種類	阻害率 (%)	抽出液中のエキス量 (g/100ml)	比阻害率* (%)
対照	0	0	
ウリ科			
キュウリ	-25	2.4	-521
ニホンカボチャ	-38	4.9	-388
キク科			
ゴボウ	88	3.4	1294
レタス	-2	1.4	-71
ヒツジグサ科			
ハス	212	7.5	1413
ショウガ科			
ショウガ	16	5.3	151
ユリ科			
ニラ	112	3.9	1436
ニンニク	89	19.6	227
タマネギ	27	4.6	293
ネギ	12	3.5	171
アブラナ科			
カンラン	49	3.2	766
ダイコン	31	2.1	738
ナス科			
トマト	75	2.5	1500
バレイショ	50	10.4	240
ピーマン	-112	4.2	-1333
ナス	43	3.0	717
セリ科			
セロリ	-56	3.1	-903
ニンジン	-44	4.2	-524
パセリ	204	4.5	2267
マメ科			
ダイズ	ND	21.9	ND
サイトウ	ND	21.2	ND
アズキ	ND	22.1	ND
ツユマメ	29	2.8	518
ヒルガオ科			
サツマイモ	-9	14.9	-30

* 植物抽出1g当たりの阻害率(%)

ND ろ液混濁のため測定不能

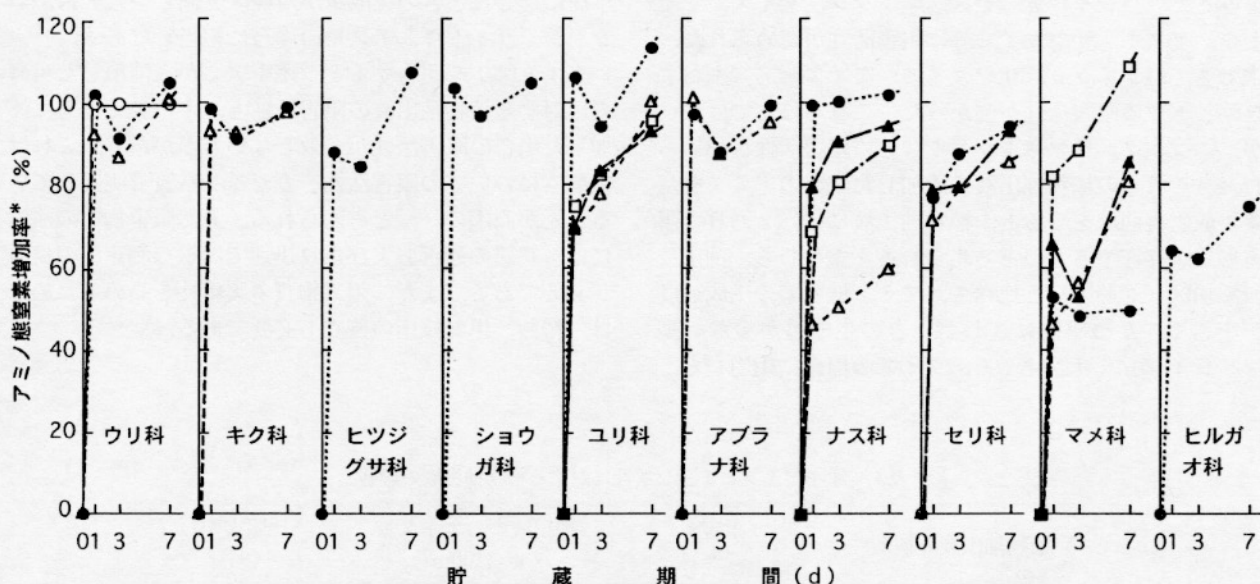


図1 植物抽出液を添加したオキアミ塩辛の貯蔵中におけるアミノ態窒素増加率の変化

対 照: ○

ウ リ 科: ●, キュウリ; △, ニホンカボチャ

ヒツジグサ科: ●, ハス

ユ リ 科: ●, ニラ; △, ニンニク; ▲, タマネギ; □, ネギ

ナ ス 科: ●, トマト; △, パレイショ; ▲, ピーマン; □, ナス

マ メ 科: ●, ダイズ; △, サイトウ; ▲, アズキ; □, ツユマメ

* 対照区に対する試験区のアミノ態窒素増加量の比 (%)

キ ク 科: ●, ゴボウ; △, レタス

ショウガ科: ●, ショウガ;

アブラナ科: ●, カンラン; △, ダイコン

セ リ 科: ●, セロリ; △, ニンジン; ▲, パセリ

ヒルガオ科: ●, サツマイモ

要 約

南極産オキアミ塩辛の熟成を制御するため、植物性食品24種の水抽出物によるオキアミプロテアーゼの阻害について検討した。

(1) オキアミ粗酵素に対して、カゼインを基質とした場合、ハス>パセリ>ニラ>ニンニクゴボウ>トマト>パレイショ<カンランの順に強い阻害活性が認められた。比阻害率の大きさは、パセリ>トマト>ニラ<ハス>ゴボウ>カンラン>ダイコン>ナスの順であった。マメ科植物はろ液混濁のため測定不能であった。

(2) 植物抽出液を添加した塩辛のアミノ態窒素生成量から阻害活性をみると、パレイショ、ナス、ニンジン、ダイズ、サイトウ、アズキ、サツマイモに強い活性が認められた。

本実験を実施するにあたり、ご協力を頂いた社団法人新食品研究協議会に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 中川禎人・前重静彦: 広島県立食品工業技術センター研究報告, 19, 1 (1989).
- 2) 中川禎人・前重静彦: 広島県立食品工業技術センター研究報告, 20, 1 (1993).
- 3) 木村 進: 化学と生物, 13, 432 (1975).
- 4) WEITZE, G. and ZOLLNER N.: 蛋白質分解酵素インヒビター, 鈴木友二・長沢滋治・山口 登訳 (共立出版, 東京), p.9 (1974).
- 5) 伊吹文男: 栄養と食糧, 32, 75 (1979).
- 6) TOYOHARA H., KINOSHITA M., KIMURA I., SATAKE M. and SAKAGUCHI M.: *Fisheries Science*, 61, 531 (1995).
- 7) 萩原文二・米谷 隆・山本武彦・小巻利章: 酵素研究法, 2巻, 赤堀四郎・丸尾文治・佐竹一夫・藤茂 宏・笹川泰治・関根隆光編 (朝倉書店, 東京), p.238 (1956).