

海洋細菌由来のプロテアーゼインヒビター添加による マイワシかまぼこゲル強度増強効果

今田千秋,^{1*} 西本真一郎,² 原 三郎³

(2000年2月4日受付, 2000年8月15日受理)

¹東京水産大学大学院食品生産学専攻, ²マルハ株式会社中央研究所, ³京都工芸繊維大学応用生物学科

The Effect of Addition of Protease Inhibitor from Marine Bacterium
on the Strength of Gel Formation of Sardine Meat Gel (Kamaboko)

Chiaki Imada,^{1*} Shin-ichiro Nishimoto,² Saburo Hara³

¹Course of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Tokyo 108-8477, ²Maruha Corporation Central Research Institute, Ibaraki 300-4295, ³Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan

The effect of crude protease inhibitors of marine bacterial origin on the formation of gels from various fishes such as krill, sardine and squid meat paste (surimi) was investigated. Among them, crude protease from sardine was strongly inhibited followed by krill whereas no inhibition was observed in squid. Various naturally occurring protease inhibitors were mixed with bacterial ones and the inhibitory effect on the crude protease from sardine was also determined. The most effective one was leupeptin from terrestrial actinomycete. The crude inhibitors of microbial origin were fractionated by DEAE-cellulofine column chromatography, resulting in two active fractions. The fraction eluted first, marinostatin (simple peptide), had an inhibitory activity against serine protease whereas the second one, monastatin (glycoprotein), had an inhibitory activity against cysteine protease. The inhibitory effect of these inhibitors on the formation of gel was performed. The elasticity and jelly strength of gel from sardine surimi was effective in the presence of monastatin whereas no such effect was observed in the presence of marinostatin, suggesting that the former one might be applicable to cooked fish meat gel (Kamaboko).

キーワード: プロテアーゼインヒビター, マリノスタチン, モナスタチン, 海洋細菌, マイワシ

かまぼこなどの魚肉すり身製品は噛んだときの歯ごたえや弾力性によってその品質が左右されるが、このすり身の加工の際の熱処理において魚肉筋肉中に存在するプロテアーゼがすり身に作用し、弾力性の乏しい品質の悪いものがしばしば生じることが知られている。¹⁻³⁾ 魚肉筋肉中にはカテプシン D、中性およびアルカリプロテアーゼなどが存在するが、このうちアルカリプロテアーゼのみが熱に安定であり、加熱の際にすり身に作用し、品質を低下させることがある。⁴⁾ これまでこのプロテアーゼ活性を抑制するために卵白⁵⁾や牛血清蛋白⁶⁾および大豆やリ

マ豆⁷⁾等プロテアーゼインヒビター (PI) を含む天然物をすり身に添加してその影響を調べる試みが行われているが、十分な効果を上げているとは言えず、より有用な物質の開発が望まれていた。

我々は以前報告したように⁸⁻¹²⁾ PIを生産する海洋細菌を初めて海洋環境から分離し、その培養液から単純ペプチドで構成されるセリン PI「マリノスタチンと命名」と糖蛋白質で構成されるシステイン PI「モナスタチンと命名」を単離しているが、今回これらの PIを魚肉すり身に添加しその効果を調べたので報告する。

* Tel and Fax : +81-3-5463-0404, E-mail : imada@tokyo-u-fish.ac.jp

材料と方法

PI 粗精製物の調製 PI 生産海洋細菌 *Alteromonas* sp. B-10-31⁹⁾ 株を本実験に用いた。なお本菌の培養にはバッフル付きの 500 mL 容三角フラスコを用い、これに Bacto-yeast extract (Difco) 0.1%, glucose 0.05%, Polypepton (日本製薬) 0.6% を添加した人工海水 (ジャマリン S, pH 7.0) 100 mL を加え植菌後、25°C において 18-24 時間回転振とう培養した。培養後、遠心分離 (10,000 rpm, 20 分間) によって菌体を除いた上清をダイアイオン HP-20 (40×450 mm) カラムに吸着させた後、0.01% 酢酸でカラムを洗浄し、ついで 50% アセトン 40 mL で PI を溶出させた後、減圧乾固したものを蒸留水に再溶解し、PI 粗精製物 (CPI) として用いた。

試薬 卵白、ロイペプチン、アルファ 2 マクログロブリン、トリプシンインヒビター、ズブチリシンおよびパパインを Sigma 社より購入し、以下の実験に用いた。

魚肉粗プロテアーゼの調製 魚肉粗プロテアーゼは各種すり身 (マイワシ, オキアミ, マルハ社製) やスルメイカ外套筋肉から調製した。これらの魚肉それぞれ 30 g を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 90 mL 中でホモジナイズした後、遠心分離によって得た上清と沈殿に同量の緩衝液を加え再度遠心分離した上清を合一し、透析チューブにつめその内液をポリエチレングリコールを用いて 3 mL まで濃縮し 4°C にて貯蔵後、粗酵素液として実験に供した。なお、これらの粗酵素液の蛋白質濃度をビウレット法で測定したところマイワシ, オキアミおよびスルメイカ外套筋肉でそれぞれ、15.9, 60.3 および 94.5 mg/mL であった。

粗酵素に対する PI の阻害活性測定法 各種粗酵素に対する効果は CPI の粗酵素液に対する酵素活性の阻害度から判定した。すなわち粗酵素液 25 μ L と PI (4 mg/mL) 25 μ L を混合後、30°C において 12 分間前インキュベーションし、これにコイミオシン溶液 (市販のコイからミオシンを調製したもの; 9 mg/mL in 0.5 M KCl-20 mM Tris-HCl, pH 7.5) 50 μ L を添加した後、30°C にて 60 分間インキュベーションし、さらに 50°C にて 20 分間放置させた後 2% SDS-2% 2-メルカプトエタノール溶液 200 μ L を加えて 100°C にて、1 分間煮沸し、酵素反応を停止させた。なお、ミオシンの調製は碓谷らの方法¹³⁾に準じた。これを SDS-ポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動¹⁴⁾に付しその泳動パターンより PI の阻害効果を調べた。

すり身における CPI 添加の評価 マイワシのすり身 100 g に各種濃度の CPI と NaCl 3 g を加えて塩ずりした後、擂潰し (10 分間)、折径 48 mm の塩化ビニリデンケーシングに充填し、30°C にて 90 分間坐り処理を行った。これを 90°C にて、40 分間加熱後、形成したゲルを厚さ 25 mm に切り、Fudoh レオメーター (レオテック社製) で 5 ϕ mm の円柱状プランジャーによるゲル破断強度を測定した。また、ゲルの白度測定はミノルタ色彩色差計 (CT-210 型) を用いて行った。

PI の分画方法 CPI を緩衝液 (50 mM Na-phosphate, pH 6.0) に溶解させた後、あらかじめ同緩衝液で平衡化させた DEAE-cellulofine カラム (30×200 mm) に供し、NaCl の直線濃度勾配溶出 (0-1.0 M) を行い、溶出してきた各画分 (84 mL) について PI 活性の測定を行った。なお、PI 活性はアッセイ酵素としてズブチリシンとパパインを用い、それぞれマリノスタチンおよびモナスタチン画分の活性を測定した。マリノスタチンは Imada *et al.*⁹⁾の方法に準じて行い、ズブチリシンに対する阻害度から PI 活性を算出した。モナスタチンはパパインを 100 μ g になるように 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解したもの 0.5 mL と同緩衝液に溶解したモナスタチン溶液 0.5 mL および 0.1 mL (0.1 M Cys+0.04 M EDTA) を混合し、27°C にて、12 分間ブレインキュベーションした。これに 1% カゼイン溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 0.5 mL を加え 12 分間反応させた。反応後、5% トリクロル酢酸溶液 2 mL を加えて酵素反応を停止させた後、未消化カゼインを濾過して取り除いた濾液について 280 nm における吸光度を測定し、阻害活性をもとめた。なお、阻害活性 1 unit は、酵素活性を上記反応条件で、50% 阻害させるインヒビター量と定義し、阻害の割合は次式より求めた。

$$\text{阻害\%} = (1 - B/A) \times 100(\%)$$

A; 上記反応条件でのインヒビター非存在下での 280 nm の吸光度の上昇量。

B; 上記反応条件でのインヒビター存在下での 280 nm の吸光度の上昇量。

結果および考察

マイワシすり身に PI を添加してその効果を調べる前に CPI の粗酵素に対する阻害度を検討した。

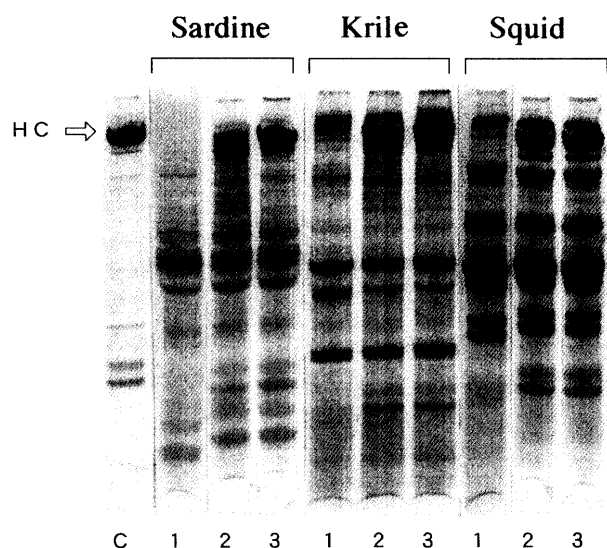


Fig. 1. The inhibitory effect of crude PI (CPI) on various crude proteases (CP) from surimi by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. C, Carp myosin (M); 1, CPI; 2, M+CP; 3, M+CP+CPI; HC, Myosin heavy chain

Fig. 1に SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による各種粗酵素液に対する CPI の阻害効果を示した。これらの中ではマイワシの粗酵素液に最も高い阻害効果が見られ、コイミオシン重鎖はほとんど分解されなかった。また、オキアミについても若干の阻害効果が認められたが、スルメイカ外套筋肉には全く認められなかった。このうち最も効果のあったマイワシの CP について粗 PI と他の市販の PI の併用効果を調べたところ、Fig. 2 に示すように放線菌由来のロイペプチンが最も有効であることが判明した。長久ら¹⁵⁾も *pacific hake* のすり身のゲル形成にロイペプチンを添加しており、ゲル強度の高いかまぼこを得ているが、このロイペプチンはトリプシントypesのセリンプロテアーゼとシステインプロテアーゼの活性を特異的に抑制することから、マイワシやオキアミのすり身、特にマイワシにはこのプロテアーゼが多く含まれていると推定される。ただこの PI は大変高価である上にその分子中にアルデヒド基を有すること¹⁶⁾や催奇性があることなど様々な問題を抱えているため、食品添加物としてすり身へ応用するのは困難であると思われる。

次にマイワシの CP に対する阻害効果が認められた CPI をマイワシすり身に添加しその物性について検討した。Table 1 にマイワシすり身のゲル形成における PI の添加効果を示した。この表から明ら

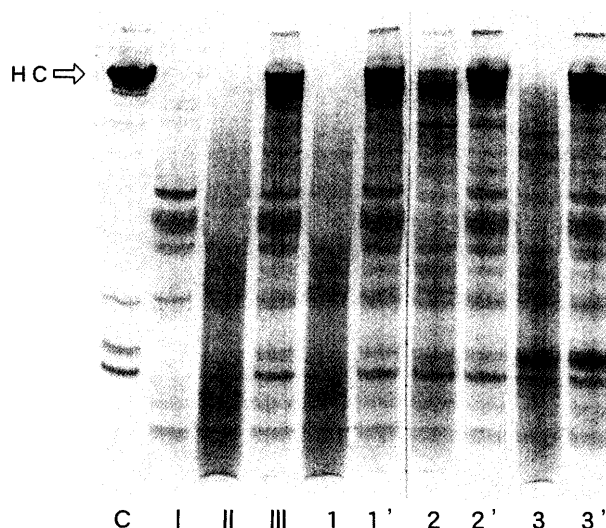


Fig. 2. The inhibitory effect of various naturally occurring PI added with CPI on crude sardine protease by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. C, Carp myosin (M); I, CP from sardine; II, M+CP; III, M+CP+PI; HC, Myosin heavy chain 1, α 2-Macroglobulin (Bovine); 1', 1+PI, 2, Leupeptin; 2'+PI, 3, Trypsin inhibitor (Soybean); 3', 3+PI

Table 1. The effect of crude PI (CPI) on the gel formation of sardine surimi

PI concentration (%)	Breaking strength (g)	Breaking strain (mm)	Whiteness
0	94	5.4	25.8
0.05	315	7.3	24.0
0.1	435	8.8	22.6
0.20	513	9.1	20.5
1.0* ¹	402	8.0	23.6

*¹ Egg white

かなように PI の添加量の増加に伴い、ゼリー強度および凹みの値は増加したが、白度は減少した。なお、前二者の値は天然物では数種類の PI が含まれていると言われる卵白よりも高い値であった。なお、本粗 PI には性質の全く異なる 2 種類の PI が含まれているため、各々の効果を調べるために PI 粗精製物の部分精製を行った。その結果を Fig. 3 に示す。モナスタチン画分は非吸着画分に溶出したのに対し、マリノスタチンは NaCl 0.6-0.7 M に溶出した。これらの画分（フラクションナンバー 2-8 および 30-36）を別々に集め凍結乾燥し、必要に応

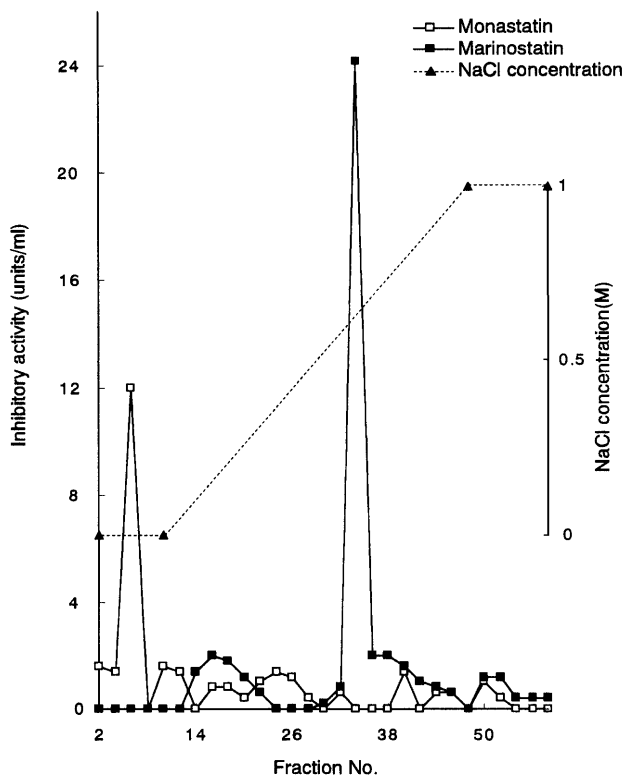


Fig. 3. The elution pattern of PI by DEAE-cellulose column chromatography. Fractions of 12 mL were collected.

Table 2. The effect of marinostatin on the gel formation of sardine surimi

Marinostatin concentration (%)	Breaking strength (g)	Breaking strain (mm)
0	247	7.2
0.075	238	7.0
0.150	227	6.6
0.225	229	6.8
0.300	220	6.6

Table 3. The effect of monastatin on the gel formation of sardine surimi

Marinostatin concentration (%)	Breaking strength (g)	Breaking strain (mm)
0	206	6.6
0.04	287	7.7
0.08	369	8.4
0.12	352	8.3
0.16	368	8.4

じ蒸留水で溶解したのち以後の実験に供した。

Table 2 および 3 にマイワシすり身におけるマリノスタチンおよびモナスタチン画分を添加したときのゲル形成能をそれぞれ示す。マリノスタチンはその添加量を増加させてもゼリー強度や凹みの値に全く変化が認められなかったのに対し、モナスタチンは添加量の増加に伴いこれらの値の上昇が認められた。志水ら¹⁷⁾はいくつかの魚種のすり身についてゲル形成能を測定しているが、この値は魚種によって大きく変動し、トビウオやヒラメなどではこの値は高く、またマイワシ、マサバ、サンマなどでは低いことを報告している。本研究においてマイワシすり身についてモナスタチンを添加すると品質のよいゲルができることが明らかとなっているため、今後これらのすり身にモナスタチンを添加したときの影響を調べることも必要であると思われる。

文 献

- 1) Lanier TC, Lin TS, Hamann DD, Thomas FB. Effects of alkaline protease in minced fish on texture of heat-processed gels. *J. Food Sci.* 1981; **46**: 1643-1645.
- 2) Burgarella JC, Lanier TC, Hamann DD. Effects of added white or whey protein concentrate on thermal transitions in rigidity of croaker surimi. *J. Food Sci.* 1985; **50**: 1588-1594.
- 3) Burgarella JC, Lanier TC, Hamann DD, Wu MC. Gel strength development during heating of surimi in combination with egg white or whey protein concentrate. *J. Food Sci.* 1985; **50**: 1595-1597.
- 4) Makinodan Y, Toyohara H, Niwa E. Implication of muscle alkaline proteinase in the textural degradation of fish meat gel. *J. Food. Sci.* 1985; **50**: 1351-1355.
- 5) Chang-Lee MV, Lampila LE, Crawford DL. Yield and composition of surimi from pacific whiting (*Merluccius productus*) and the effect of various protein additives on gel strength. *J. Food Sci.* 1990; **55**: 83-86.
- 6) Morrissey MT, Wu JW, Lin D, An H. Protease inhibitor effects on torsion measurements and autolysis of pacific whiting surimi. *J. Food Sci.* 1993; **58**: 1050-1054.
- 7) Miller R, Spenelli J. The effect of protease inhibitors on proteolysis in parasitized pacific whiting, *Merluccius productus*, muscle. *Fish. Bull.* 1982; **80**: 281-286.
- 8) Imada C, Simidu U, Taga N. Isolation and characterization of marine bacteria producing alkaline protease inhibitor. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1985; **51**: 799-803.
- 9) Imada C, Taga N, and Maeda M. Cultivation conditions for subtilisin inhibitor-producing bacterium and general properties of the inhibitor "Marinostatin". *Nippon Suisan Gakkaishi* 1985; **51**: 805-810.
- 10) Imada C, Maeda M, Taga N. Purification and characterization of the protease inhibitor "marinostatin" from a marine *Alteromonas* sp. with reference to inhibition of the protease produced by a bacterium pathogenic to fish. *Can. J. Microbiol.* 1985; **31**: 1089-1094.
- 11) Imada C, Maeda M, Hara S, Taga N, Simidu U. Purification and characterization of subtilisin inhibitors

- “Marinostatin” produced by marine *Alteromonas* sp. *J. Appl. Bacteriol.* 1986; **60**: 469-476.
- 12) Imada C, Hara S, Maeda M, Simidu U. Amino acid sequences of marinostatins C-1 and C-2 from marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1986; **52**: 1455-1459.
- 13) 碓谷敏紀, 木村郁夫, 新井健一. コイ背肉ミオシンからサブフラグメント-1 の調製とその生化学的性質について. 日水誌 1981; **47**: 947-955.
- 14) Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969; **244**: 4406-4412.
- 15) 長久英三, 西室祥子, 藤田孝雄: Pacific hake ゼリーミートのカマボコ形成能. 日水誌 1986; **49**: 901-906.
- 16) Kawamura K, Kondo S, Maeda K, Umezawa H. Structures and synthesis of leupeptins Pr-LL and Ac-LL. *Chem. Pharm. Bull.* 1969; **17**: 1903-1909.
- 17) 志水 寛, 町田 律, 竹並誠一: 魚肉肉糊のゲル形成特性に見られる魚種特異性. 日水誌 1981; **47**: 95-104.