

<平成19年度>

種実由来のプロテアーゼを用いた高齢者向け多機能食品の開発

朝倉 富子 ・ 田村 倫子 ・ *舟木 淳子

(東京大学大学院農学生命科学研究科, *福岡女子大学人間環境学部)

1. はじめに

高齢者が健康で豊かな生活を送るための施策が次々に打ち出されているが、その中で特に食生活をどのように送るかが大きな課題の一つとなっている。高齢者は咀嚼、嚥下能力が衰えているが、長年の食経験から、嗜好性に対する要求は高いと考えられる。本研究では、プロテアーゼを用いて栄養面、嗜好面、また、生体調節能を高めるような機能を食品同時に付与することを目的としている。

プロテアーゼは食品加工において、重要な働きをするものが多い。凝乳酵素キモシンをはじめとして多くの発酵食品では、微生物の生産する酵素によって食品に新たな風味、色、物性が付与される。大豆から納豆が作られるように、様々な味と物性が変化した食品を作る例が極めて多い。また、植物由来のプロテアーゼも、肉の軟化に利用されたり、小麦のシステインプロテアーゼグリアダインのように、小麦グルテンの分解に関与するものが報告されている¹⁾。これらの酵素群は、食品加工に大きな貢献をしているにも関わらず、酵素を用いて高齢者に好まれる味や物性を付与した食品の生産を目指そうという試みは意外に少ない。

食品のゲル化は食材に多彩なテクスチャーを付与し、素材本来の特性を向上させるとともに、新たなテクスチャーを生み出す^{2, 3)}。食品加工、調理では、ゲル化によって食品の可能性が広がる。ゲル状食品の素材は、でんぷん、ペクチン、寒天

など高分子炭水化物と、卵、大豆、魚肉、ゼラチンのようなタンパク質に大別される^{4~9)}。タンパク質は栄養的価値が高く、高齢者の食事では不足しがちである。そこで、本研究は高齢者にも摂取しやすいタンパク質性食品を開発することを目的とする。

タンパク質ゲルのモデルとしてソーセージを用い、プロテアーゼによるユニークなテクスチャーを備えた食品の開発を目指した。物性評価には官能評価に加え、クリープメータを用いた破断強度解析を行い、得られた応力-歪曲線を用いる新たな評価方法の確立も試みた。

2. 実験材料と方法

2.1 試料

ポークソーセージ（鹿児島県経済農業協同組合連合会 KB）を用いた。

2.2 プロテアーゼ

プロテアーゼは、パパイン W-40（天野エンザイム株式会社）を用いた。パパイン W-40（以下パパイン）のプロテアーゼ活性をアンソン-萩原変法により測定した。緩衝液には McIlvaine buffer (pH 7.0) を用いた。1 分間に 1 μg のチロシンを遊離させる活性を 1 ユニット (U) とした。

2.3 プロテアーゼ浸漬

試料を、包丁を用いて 20 × 20 × 20 mm に切断し、パパインを脱イオン水に溶解したプロテアーゼ溶液 1.5ml [5%食塩（財団法人塩事業セン

ター)を含む]に、4℃で96時間浸漬した。パパイン濃度は2.5%とした。このようにして調製したゲルを、以下パパイン浸漬タンパク質ゲルとした。パパイン溶液を用いずに同様に調製したものを対照タンパク質ゲルとした。

2.4 外観の観察

パパイン浸漬タンパク質ゲルおよび対照タンパク質ゲルの外観を観察し、撮影を行った(SP-700, オリンパス株式会社)。

2.5 破断強度解析による物性測定

クリープメータ(RHEONERIIシリーズ RE2-33005S, 株式会社山電)を用い、2.5%パパイン浸漬タンパク質ゲルおよび対照タンパク質ゲルの破断強度解析を行い応力-歪曲線を得た。測定は、直径3 mmのプランジャーを用い、測定速度1 mm/秒、歪率99%まで行った。

2.6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

パパイン浸漬タンパク質ゲルのタンパク質分解をLaemmli¹⁰⁾の方法によりSDS-PAGEを行い観察した。泳動用試料は、パパイン浸漬タンパク質ゲル0.9 gに脱イオン水を加えてホモジナイザー(バイオミキサー, 株式会社日本精機製作所)で均質化後50 mlにし、150 μ lを測定に用いた。サンプル緩衝液(4.3% SDS, 30%グリセロール, 10% 2-メルカプトエタノール, 0.01%ブロモフェノールブルーを含む125 mM トリスアミノメタン)を150 μ l加えた後、3分間煮沸した。調製した試料を10~20%ポリアクリルアミドゲル

(コスモバイオ株式会社)により泳動を行った。泳動用緩衝液には0.1% (w/v) SDSを含むトリス-グリシン緩衝液(pH 8.3)を用いた。マーカーはタンパク質分子量マーカーII(テフコ株式会社)を使用した。泳動後、染色液[電気泳動用ページブルー83(CBB R-250), 第一化学薬品株式会社]を用いて染色した。

2.7 テクスチャーの官能評価

二点嗜好試験法によってパパイン浸漬タンパク質ゲルと対照タンパク質ゲルの硬さについて比較した(柔らかい方を選んだ)。パネルは学生8名とした。

3. 結 果

3.1 プロテアーゼ活性

pH 7.0におけるパパインのプロテアーゼ活性は、 5.22×10^5 U/gであった。

3.2 パパイン浸漬タンパク質ゲルの外観

パパイン浸漬タンパク質ゲルの外観は、対照タンパク質ゲルと比較してゲルの角がやや丸みを帯びているが、対照タンパク質ゲル同様の形状であった。また、色も両者で差異はなかった(図1)。

3.3 パパイン浸漬タンパク質ゲルの物性測定

パパイン浸漬タンパク質ゲルおよび対照タンパク質ゲルについて、クリープメータによる破断強度解析で得られた応力-歪曲線を比較した(図2)。

対照タンパク質ゲル(パパイン未処理)では、歪率15%付近で最初の破断点が見られ、その後、何回も破断を繰り返す波型の応力-歪曲線を示し

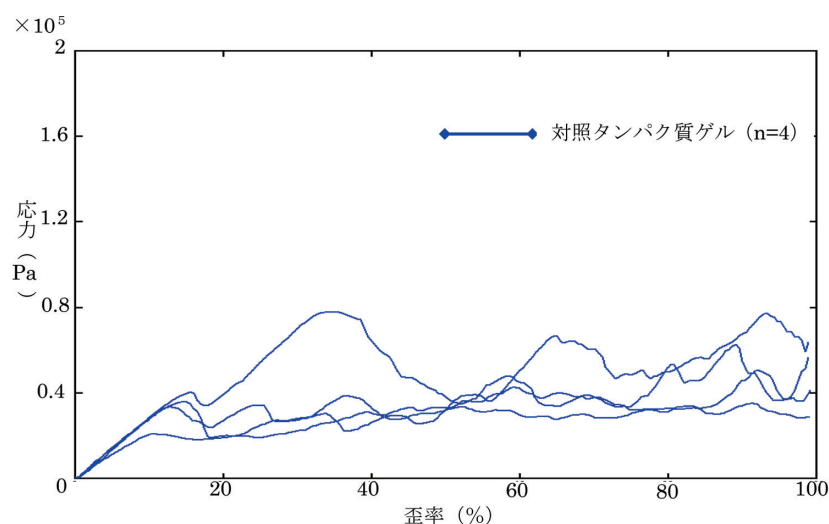


対照タンパク質ゲル

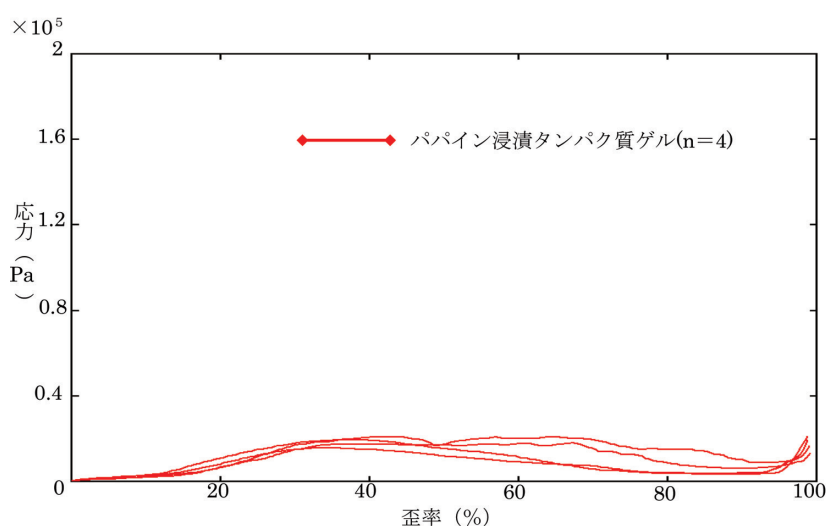


パパイン浸漬タンパク質ゲル

図1 パパイン浸漬タンパク質ゲルの外観



対照タンパク質ゲルの応力—歪曲線



パパイン浸漬タンパク質ゲルの応力—歪曲線

図2 パパイン浸漬タンパク質ゲルの応力—歪曲線

た。すなわち、未処理のソーセージは、不均一な硬さ物性を示すことが、応力—歪曲線から示された。

一方、パパイン処理をしたタンパク質ゲルは、対照タンパク質ゲルとは明らかに異なり、明瞭な破断点を示さない応力—歪曲線を示した。すなわち、延性流動を示し、クリームチーズ様の物性を持つことが示された。

3.4 パパイン浸漬タンパク質ゲルのテクスチャーの官能評価

パパイン浸漬タンパク質ゲルと対照タンパク質ゲルでは、パネル8人全員がパパイン浸漬タンパク質ゲルの方が柔らかいと回答した（表1）。危険率1%でパパイン浸漬タンパク質ゲルの方が柔らかいと判断できた。クリープメータによる物性測定結果を支持する結果となった。

表1 パパイン浸漬タンパク質ゲルの柔らかさについての官能評価
(柔らかいと回答した人数)

	対照タンパク質ゲル	パパイン浸漬タンパク質ゲル
柔らかさ**	0	8

(** 1%の危険率で有意差あり)

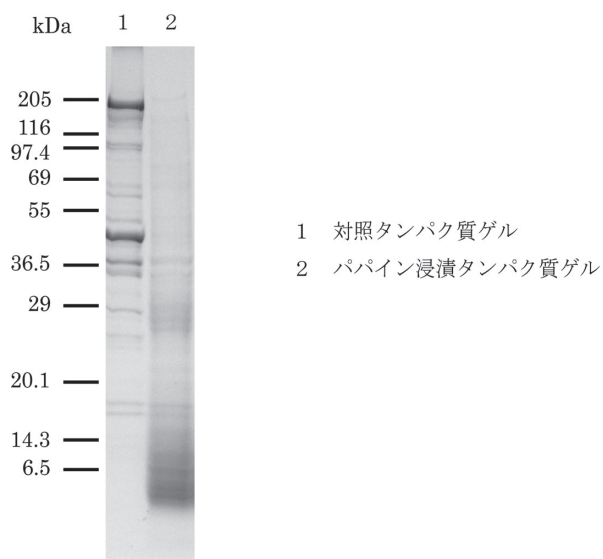


図3 パパイン浸漬タンパク質ゲルのタンパク質分解

3.5 パパイン浸漬タンパク質ゲルのタンパク質分解

パパイン浸漬タンパク質ゲルと対照タンパク質ゲルのタンパク質の変化をSDS-PAGEにより観察した(図3)。

パパイン未処理のソーセージは、ミオシンヘビーチェーン(MHC)やアクチンなどが、明瞭なバンドとなって現れるが、パパイン処理したタンパク質ゲルではこれらの主要タンパク質は分解を受け、低分子化していた。

4. 考 察

パパインを用いて、ソーセージを軟らかく嚥下しやすいゲルに改良することに成功した。4℃, 96時間, パパイン溶液に浸漬することによってブロック状のソーセージは、外観を変えることなく、滑らかなクリームチーズ様の物性を示すようになった。パパイン処理したソーセージでは、外側は噛み切る必要のない程度(歯がなくても食べられる程度)の柔らかさになっていたが、内部にやや硬さの残る部分があった。内部まで均一な柔らかさのゲルにするためには、酵素濃度やブロックの大きさ等を工夫する必要がある。

一般にプロテアーゼをタンパク質に作用させて

低分子化が生じると苦味を有するペプチドが出現し、食品に苦味を与える。たとえば、ヨーグルトにプロテアーゼ活性の強いフルーツを加えると苦味が増すように、プロテアーゼを作用させる場合には、注意が必要である。今回パパインによってソーセージを構成する肉タンパク質は低分子にまで分解されたが、苦味は出現せず、物性のみを改変することができた。プロテアーゼによって低分子化されたペプチドは、もとの肉タンパク質よりも消化性が高いことが予想される。我々は、以前、豆腐に *Aspergillus saitoi* のプロテアーゼ製剤であるモルシンを作用させたところ、豆腐をクリームチーズ様の物性に变化させることに成功した。モルシンには、 β -グルコシダーゼ活性があることから、豆腐中の配糖体型イソフラボンは糖が切り出されて、より生理活性の高いアグリコンが増加した。モルシン処理によって、豆腐の物性を改変するだけでなく、生理機能を高めることにも成功している¹¹⁾。

プロテアーゼ処理は、物性のみならず、栄養的特性を改変する可能性を有することが示唆された。これらは、他のタンパク質ゲルにも広く応用することが可能であり、今後、高齢者だけではなく、新しい食感を有する食品の開発にも応用できる。

謝 辞

本研究に対し多大なご支援を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Kiyosaki, T., Matsumoto, I., Asakura, T., Funaki J., Kuroda M., Misaka T., Arai S. and Abe, K. Gliadain, a gibberellins-inducible cysteine proteinase occurring in germinating seeds of wheat, *Triticum aestivum* L., specifically digests gliadin and is regulated by intrinsic cystatins, *FEBS J.* **274**, 1908-1917 (2007).

- 2) 西成勝好, 食品の物性におけるハイドロゲルに関する研究, 日本食品科学工学会誌, **52**, 385-390 (2005).
- 3) 高橋智子, 中川令恵, 道脇幸博, 川野亜紀, 鈴木美紀, 和田佳子, 大越ひろ, 食べ易い食肉のテクスチャー特性と咀嚼運動, 日本家政学会誌, **55**, 3-12 (2004).
- 4) 川野亜紀, 高橋智子, 大越ひろ, 寒天ゼリーを用いたモデル食塊のテクスチャー特性と官能評価, 日本家政学会誌, **56**, 711-717 (2005).
- 5) Hermansson, A. M. and Buchheim, W., Characterization of protein gels by scanning and transmission electron microscopy, *J. Colloid Interface Sci.*, **81**, 519-530 (1981).
- 6) Croguennec, T., Nau, F. and Brule, G., Influence of pH and salts on egg white gelation, *J. Food. Sci.*, **67**, 608-614, (2002).
- 7) Montero, P., Marti de castro, M. A., Solas, M. T., and Gomez-guillen, M. C., Textural and microstructural changes in frozen stored sardine mince gels, *J. Food. Sci.*, **64**, 838-842, (1997).
- 8) Kubota, S., Tamura, Y., Morioka, K. and Itoh, Y., Variable pressure-scanning electron microscopic observation of walleye pollack surimi gel, *J. Food. Sci.*, **68**, 307-311 (2003).
- 9) Dawson, P. L., Sheldon, B. W. and Ball, H. R. Jr., Effect of washing and adding spray-dried egg white to mechanically deboned chicken meat on the quality of cooked gels, *Poultry Sci.*, **69**, 307-312 (1990) .
- 10) Laemmle, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 11) Nishinokaki, M., Asakura, T., Watanabe, T., Kunizaki, E., Matsumoto, M., Eto, W., Tamura, T., Minami, M., Obata, A., Abe, A., and Funaki, J., Application of an *Aspergillus saitoi* Protease Preparation to Soybean Curd to Modify Its Functional and Rheological Properties, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 587-590 (2008)

Application of plant proteinases to production of multi-functional food for elderly persons

Tomiko Asakura, Tomoko Tamura and *Junko Funaki

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo and

*Fukuoka Women's University)

Proteinases play key roles in food processing. In fermented foods, many proteinases produced by microorganisms are involved in changing the flavor, taste, and rheological property of foods. Some plant proteinases are used in food processing, as well. Though the proteinases give rise to a great possibility to improve food qualities, few reports are available yet improving the property of food proteins. In this study, we tried to produce a food for elderly persons, which was given a new texture by a plant proteinase. Recently, as the number of elderly persons increases in Japan, easy-to-swallow foods are needed for elderly persons suffering from swallowing disorder. Gelation will give a smooth texture to foods and change the nutritional quality of raw food materials.

In this study, we modified sausage gels by papain treatment. They were soaked in a papain solution at 4°C for 96 hours. Papain-treated gel was analyzed for rheological property and protein characterization. The appearance of papain-treated gel was almost the same as that of non-treated gel with the corners of a sample cube broken down a little. The strain-stress relation curve of non-treated gel showed a waveform morphology revealing several maximum peaks. This pattern of strain-stress curve showed the heterogeneous hardness of the gel. A rupture was clearly detected at the limiting point of elasticity deformation. On the other hand, papain-treated gel did not show any indisputable rupture point, though it exhibited a ductile flow. These results suggested that papain-treated gel was smoother in texture than the control, indicating a similar consistency of the samples to that of cream cheese which is characterized by a ductile flow with no distinct rupture point. By a pair-comparison test, it was showed that a papain-treated sample was significantly softer than the control ($p < 0.01$). The proteins of papain-treated gel were digested into low molecular peptides having no bitter taste.

We thus succeeded in modifying nutritional and functional properties of sausage gels by using papain. These results will bring about practical uses in producing some new foods for elderly persons.