

<令和3年度助成>

## 高電界による海産物の内在性酵素の不活化

高橋 克幸<sup>1,2)</sup>・藤原 百合<sup>1)</sup>・高木 浩一<sup>1,2)</sup>・袁 春紅<sup>1,2)</sup>

(<sup>1)</sup>岩手大学 理工学部、<sup>2)</sup>岩手大学 次世代アグリイノベーション研究センター)

### 1. はじめに

海産物は栄養価が高い一方で、鮮度保持の問題や調理の手間の煩雑さから消費量が減少している。海産物は一次加工後、微生物や内在性酵素の働きによる鮮度低下を防ぐために冷凍冷蔵保存して出荷または二次加工される。魚類の筋肉中には生命の維持に不可欠なATP（アデノシン三リン酸）が含まれており、ATPが多いほど新鮮であることを示している。しかし、死後ATPは生成されず内在性酵素の働きにより、ATP、ADP、AMP、IMP、HxR、Hxの順に分解され、ATPの量が次第に減少し、鮮度が低下する。ATP～Hxまでの物質はATP関連化合物と呼ばれ味や鮮度に直結するため、制御する技術が必要となる。先行研究より、PEF処理が白エビのポリフェノールオキシターゼ（PPO）を失活した<sup>1)</sup>という報告があるものの、内在性酵素に関する報告は少ない。そのため、内在性酵素を低温、無添加で制御する技術が確立できれば、サプライチェーンの拡大や消費量の底上げが期待できる。

内在性酵素を制御させるには、立体構造を不可逆的に変化させ基質との結合を阻害する必要がある。これらの方法として、熱処理があるが、熱によりタンパク質が凝集するため物質が変性するという問題点がある。そこで本研究では、パルス電界（PEF）処理による内在性酵素の不活化に着目した。PEF処理は非加熱性で酵素失活することが可能であり<sup>2)</sup>、従来の熱処理と比較し、タンパク質が凝集せず品質が劣化しにくいという特徴がある。

本研究では、PEF処理による海産物の内在性酵素の不活化とATP関連化合物の分解防止を目的とし、

ホタテの粉末をNaCl溶液に溶かし粗酵素溶液の上清と沈殿にPEF処理を行った。また、タラのすり身にPEF処理を行い、物性に与える影響を検討した。

### 2. 実験方法

粗酵素溶液に及ぼす影響の検討では、ホタテの貝柱の粉末0.4gを56.9、95.4、500mMのNaCl溶液20mLに溶解させ遠心分離（4,000×g、4℃、5min）し、上清と沈殿に分けた。得た上清を粗酵素溶液としてPEF処理を行った。沈殿はPEF処理後、上清として使用した容量と同量のNaCl溶液を加え、遠心分離後の上清を粗酵素溶液として使用した。カチオン濃度を変更させる場合は、ホタテの貝柱の粉末0.4gを10mMのCaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、KCl、NaCl、EDTA溶液20mLに溶解させ混濁液を使用した。PEF処理後、粗酵素溶液0.6mLと基質溶液（5mM ATP、終濃度1.89mM）3mLを分注し、25℃で0～24h反応させた。反応時間経過後、15%PCAを加え、反応を停止させた。その後、ATPの分解を防ぐためpHを2.8～3.0にすばやく調整し、遠心分離（4,000×g、4℃、5min）し、2mLの上清と0.5mlの0.1Mリン酸緩衝液（pH7.5）とを混合した。ATP関連化合物の含有量を液体クロマトグラフィーを用いて定量分析した。

すり身に及ぼす影響の検討では、試供材料としてタラのすり身を使用し、すり身6gにPEF処理を行った。PEF処理後、NaClを3%になるように添加し、氷冷しながら乳鉢ですり潰し、20℃と55℃に設定した恒温槽にいれ2h反応させた。タンパク質の構造を電気泳動法にて評価し、弾力や見た目も評

価した。

図1に、PEF処理用のリアクタの概略図を示す。上清および混濁液の処理に用いたリアクタは、外径56 mm、内径53 mmの円柱型のステンレス容器を用いた。試料の上に直径48 mmのステンレス円板を置き、ステンレス円板を電極、容器を接地し電界を発生させた。電極間隔は5 mmとし、試料を9 mL入れた。沈殿またはすり身の処理に用いたリアクタは、キュベット内にシリコンで接着した白金板(25 mm × 10 mm)を電極とした、平行平板電極型リアクタを用いた。

図2に、磁気パルス圧縮回路(株式会社末松電子製作所、MPC1310S-2kSP)を示す。コンデンサ $C_0$ が充電器によって充電されたあと、サイリスタをONにすると、パルストランスを介して $C_1$ へとエネルギーが移る。 $C_1$ に充電されたエネルギーは、 $SI_1$ 、 $C_2$ による共振によってパルス幅が圧縮され、出力電圧 $v_o$ となり負荷へと出力される。図3に、粗酵素溶液中の塩濃度とエネルギーの関係を示す。粗酵素溶液に及ぼす影響の検討では、印加条件は、上清、混濁液の場合1 kV、1,000 pps、沈殿物の場合1 kV、200 ppsとし、PEF印加時間はどちらも2時間とし

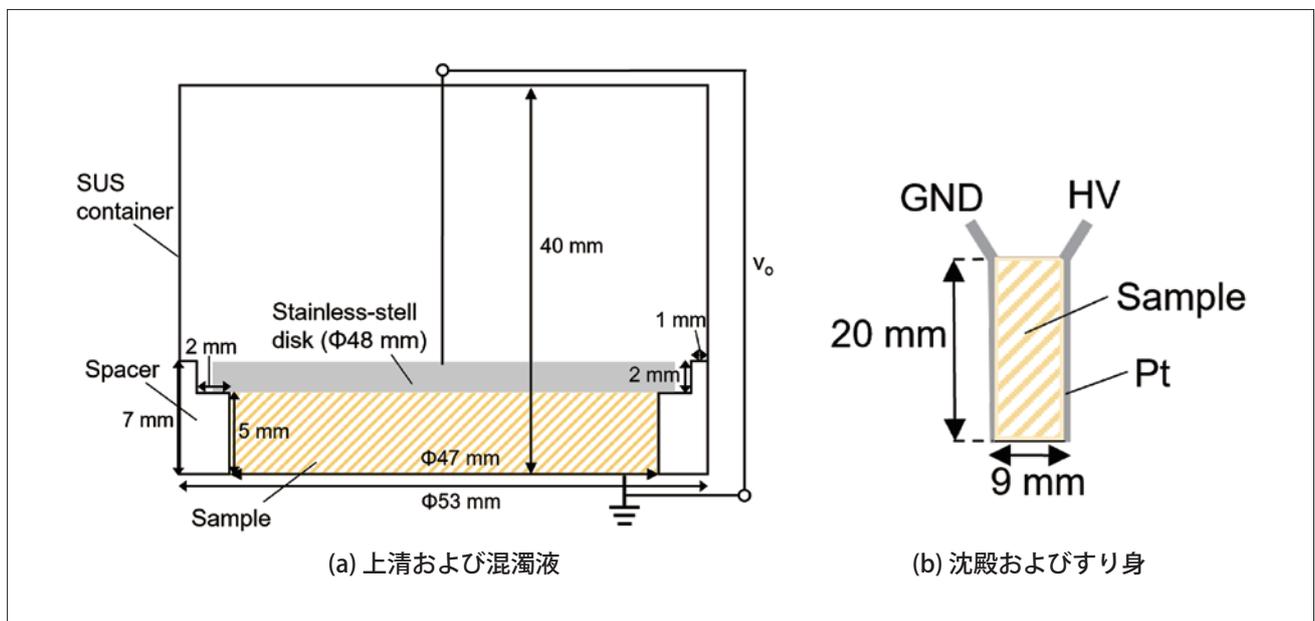


図1 PEF処理用のリアクタの概略図

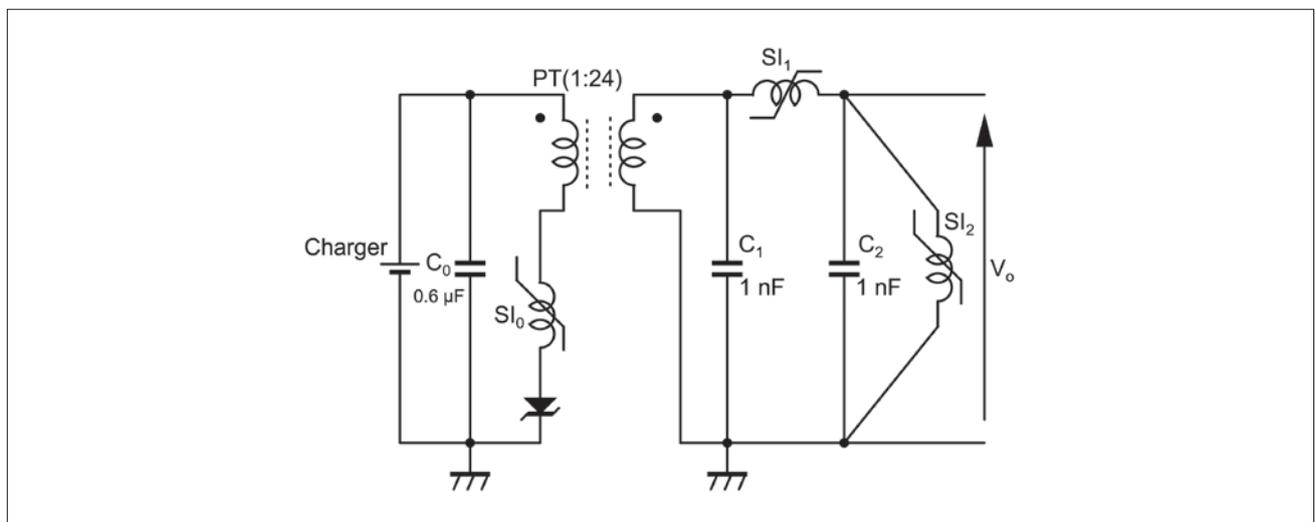


図2 磁気パルス圧縮回路 (MPC1310S-2kSP)

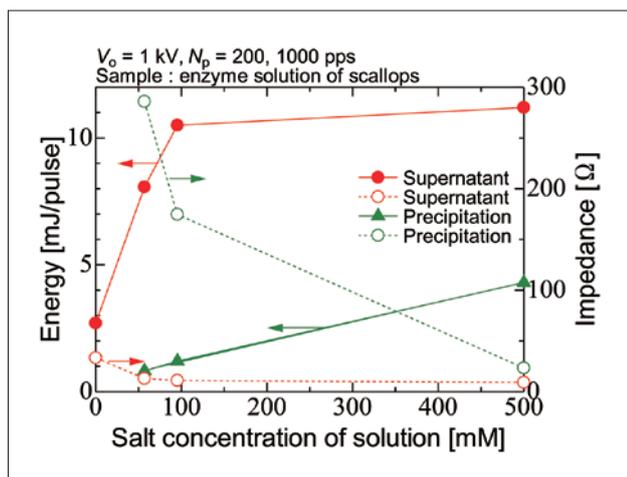


図3 粗酵素溶液中塩濃度とエネルギー

た。すり身に及ぼす影響の検討では、印加条件は 1 kV、200 pps とし、PEF 印加時間は 1 時間とした。また、処理時間と同じ時間リアクタにいた試料を Control とした。

表1 上清の ATP 関連化合物の含有量

Sample	NaCl concentration [mM]	Reaction time [h]	ATP [mM]	ADP [mM]	AMP [mM]	IMP [mM]
Control	No addition	0	1.50	0.081	0.016	N.D.
		2	1.30	0.20	N.D.	0.057
	56.9	0	1.77	0.066	0.029	N.D.
		2	1.55	0.32	N.D.	0.066
		24	1.18	0.31	0.015	0.49
		0	1.77	0.069	0.037	N.D.
	95.4	2	1.41	0.39	0.016	0.097
		24	0.25	0.59	0.47	0.74
	500	0	1.73	0.16	0.047	N.D.
		0.5	0.12	1.11	0.59	0.063
		2	0.040	0.45	1.19	0.068
		No addition	2	1.35	0.20	N.D.
56.9	2		1.66	0.13	N.D.	0.066
		24	1.38	0.28	0.012	0.39
95.4		2	1.61	0.18	N.D.	0.063
		24	1.23	0.34	0.024	0.46
500		0.5	0.12	1.17	0.56	0.059
		2	0.069	0.44	1.15	0.12

### 3. 実験結果

#### 3.1 上清の ATP 関連化合物の含有量評価

表 1 に、上清の ATP 関連化合物の含有量を示す。また、図 4 に、各塩濃度における上清の反応速度を示す。表より、ATP は、水溶性よりも塩溶性に溶け出すことがわかった。また、反応時間の経過とともに ADP、AMP、IMP の順に生成量が増加することがわかった。PEF 試料は、Control と比較し全ての条件で 24 時間経過後も ATP が残存する傾向がみられた。特に塩濃度 95.4 mM の試料でその傾向が大きくみられた。また、酵素による一次反応とした場合、反応速度定数は 95.4 mM の場合、Control は  $-2.29 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、PEF 試料では  $-3.85 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  となり 5.9 倍程度、反応速度が低下することがわかった。このことから、上清に PEF 処理をした場合、ATP 分解酵素を不活化できる可能性があることがわかった。

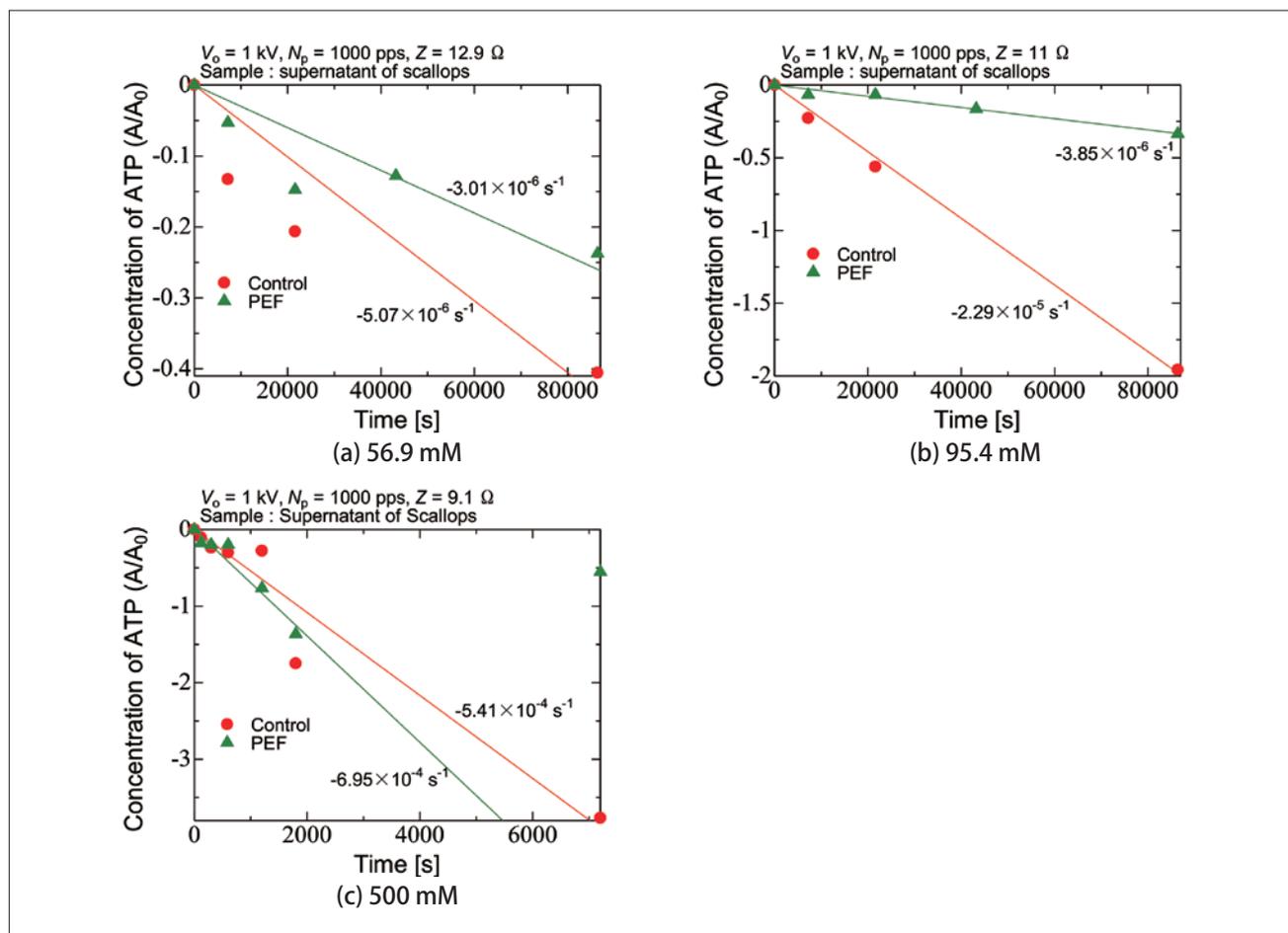


図4 各塩濃度における上清の反応速度

### 3.2 沈殿の ATP 関連化合物の含有量評価

表 2 に、沈殿の ATP 関連化合物の含有量を示す。また、図 5 に、各塩濃度における沈殿の反応速度を示す。表より、PEF 試料は、全ての条件で反応時間 24 時間経過後も ATP が残存する傾向がみられた。また、上清の反応時間 0 h と比較すると、ATP が多く残存し、ATP は上清よりも沈殿に多く含まれていることがわかった。更に、AMP と IMP は未検出な試料が多く、PEF 処理した場合、反応は ADP で停止する可能性があることがわかった。また、ATP を一次反応とした場合、反応速度定数は塩濃度 95.4 mM の場合、Control では  $-2.81 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、PEF 試料では  $-3.20 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  となり、8.8 倍程度、反応速度が低下することがわかった。このことから沈殿に PEF 処理した場合、ATP 分解酵素を不活化できる可能性があることがわかった。

### 3.3 すり身のタンパク質の構造変化

図 6 に、すり身のタンパク質構造の変化を示す。C が Control、P が PEF 処理を示している。図より、Control と PEF 処理でバンド構造に変化はみられず、タンパク質構造に与える影響は確認できなかった。また、固さ、弾力等も大きな変化はなかった。

## 4. まとめ

本研究では、PEF 処理による海産物の内在性酵素の不活化と ATP 関連化合物の分解防止を目的とし、ホタテの粉末を NaCl 溶液に溶かし粗酵素溶液の上清と沈殿に PEF 処理を行った。また、タラのすり身に PEF 処理を行い、物性に与える影響を検討した。その結果、粗酵素溶液に PEF 処理した場合、上清と沈殿ともに塩濃度 95.4 mM の場合、上清では反応速度が 5.9 倍程度低下し、沈殿では 8.8 倍程度低下

表2 沈殿のATP関連化合物の含有量

Sample	NaCl concentration [mM]	Reaction time [h]	ATP [mM]	ADP [mM]	AMP [mM]	IMP [mM]
Control	56.9	0	1.77	0.076	N.D.	N.D.
		2	1.70	0.14	N.D.	N.D.
		24	1.62	0.28	N.D.	0.034
	95.4	0	1.84	0.079	N.D.	N.D.
		2	1.65	0.20	N.D.	N.D.
		24	1.47	0.38	0.014	0.064
	500	0	1.77	0.081	0.014	N.D.
		2	1.08	0.79	0.038	0.040
		24	0.021	0.21	1.33	0.16
PEF	56.9	2	1.65	0.055	N.D.	N.D.
		24	1.70	0.11	N.D.	N.D.
	95.4	2	1.77	0.076	N.D.	N.D.
		24	1.77	0.13	N.D.	N.D.
	500	2	1.58	0.28	N.D.	N.D.
		24	0.68	0.99	0.18	0.11

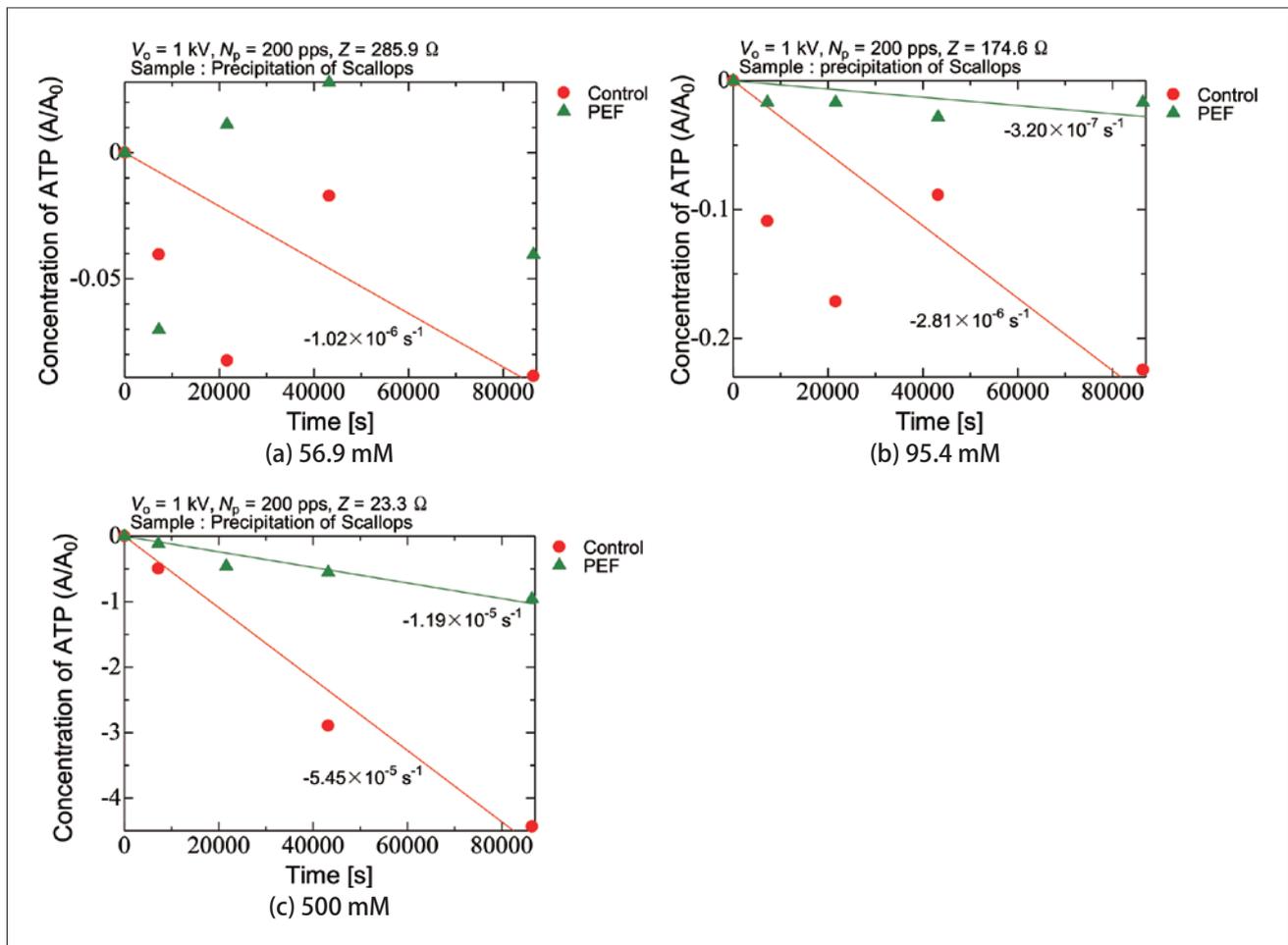


図5 各塩濃度における沈殿の反応速度

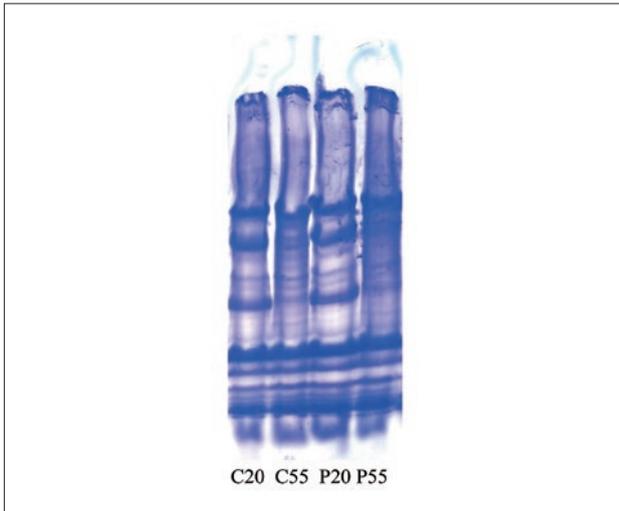


図6 すり身のタンパク質構造の変化

することがわかった。このことから、PEF 処理により ATP 分解酵素を不活化できる可能性があることがわかった。特に、沈殿においては ADP で分解が停止

する可能性があることがわかった。すり身に PEF 処理した場合、バンド構造に変化がないことから、タンパク質の構造に与える影響は小さいことがわかった。また、現印加条件では、弾力や固さに変化はみられなかった。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Khursheed Ahmad Shiekh, Soottawat Benjakul., *Journal of Food Process Preserv.*, Vol. 44, No. 4, 2019
- 2) Kui Zhong, *et al*, *Food Chemistry.*, Vol. 92, pp.473 - 479, 2005

## **Inactivation of endogenous enzymes in scallops using pulsed electric field treatment**

**Katsuyuki TAKAHASHI<sup>1,2)</sup>, Yuri FUJIWARA<sup>1)</sup>, Koichi TAKAKI<sup>1,2)</sup>,  
and Chun Hong Yuan<sup>1,2)</sup>**

*<sup>1)</sup> Faculty of Science and Engineering, Iwate University*

*<sup>2)</sup> Agri-innovation Center, Iwate University*

While seafoods contain much nutrition, consumption has decreased due to issues regarding maintaining freshness and time and effort involved in cooking. ATP-related compounds are degraded by enzymes, which affects both the freshness and taste of seafoods. Pulsed electric field (PEF) treatment is an effective method of inactivating enzymes. In this study, the inactivation of endogenous enzymes in scallops to prevent degradation of ATP-related compounds via PEF treatment was investigated. As the experimental setup, a crude enzyme solution was prepared by dissolving powdered scallops into a NaCl solution. 9 mL of the resulting solution was placed in a stainless-steel container, after which the container was placed in a cool water bath to maintain a solution temperature of 7°C. A pulsed voltage with an amplitude of 1 kV, a pulse width of 180 ~ 1040 ns, and a pulse repetition rate of 1000 pps was then applied to a stainless-steel disk placed in the solution. This treatment was applied to the solution for 2 hours, after which ATP (final concentration: 1.89 mM) was added as a substrate. After a reaction time of 0 ~ 24 hours, the enzymatic reaction was quenched by adding a perchloric acid solution, and ATP-related compounds were then determined via liquid chromatography. The results indicated that the reaction rate of ATP in the case of PEF treatment was lower than that of the control, which demonstrated that ATP-related compound degrading enzymes are inactivated by PEF treatment.