

機能特性を強化した畜産加工品の開発（第1報）

栗木隆吉

Development of Animal Processed Foods Enriched Functional Qualities

Takayoshi KURIKI

要 約

鶏肉発酵調味料の機能特性について、血圧上昇抑制作用や抗酸化作用を調べるとともに、機能性成分である - アミノ酪酸（GABA）の強化方法を検討した。結果は次のとおりであった。

- 1 調味料の10倍希釈液には、発酵2週間目に60%のアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性が認められたが、発酵が進むにつれて漸減し、10週時には50%程度となった。
- 2 抗酸化作用については、DPPHラジカル消去能を調べた結果、10週時には - トコフェロール（VE）に換算して約2mM相当する活性が認められた。
- 3 GABAの基質であるグルタミン酸は、グルタミナーゼ添加区では無添加区に比べて1.5倍の含量であり、10週時には12mg/mlと高かった。しかし、GABA含量については両区とも発酵期間を通じて変化せず、同程度の含量であった。
- 4 麹を真空包装して嫌気処理し、2%グルタミン酸ナトリウム溶液中に添加して培養すると、培養液中のGABAは無処理に比べて約3倍に増加した。
- 5 さらに、培養液中にピリドキサルリン酸を添加すると嫌気処理区で2割程度GABA産生が上昇した。
- 6 こうしたGABA産生強化方法は実際の仕込みで確認する必要がある。

キーワード： 鶏肉、発酵調味料、機能特性、GABA、ACE阻害活性

緒 言

近年、食品の3次特性として、生体リズムの調整や免疫系の調整などに関わる機能特性が注目されており、様々な食品においてその機能特性の解明と積極的な利用方法の研究が進められている。食肉においても、牛肉の抗疲労効果や酵素分解物の抗酸化作用などが知られている¹⁾。

一方、発酵食品にも様々な機能特性があり、動物性の発酵食品であるチーズや魚醤では、血圧の上昇を抑える活性（アンジオテンシン変換酵素阻害活性）や生体の老化防止につながる抗酸化活性などが知られている²⁾。

これまで、当センターでは岡山県工業技術センターとの共同研究で鶏肉を主原料とした発酵調味料の開発を進めてきた³⁾。この製造方法は発酵と酵素分解を併用しており、その製品には魚醤などで知られている血圧上昇抑制作用を有することが期待される。また、この調味料は、原料に中抜きと体をほとんど丸ごと利用しているため、発酵中の諸味は脂肪分を多く含む。鶏肉の脂肪は不飽和度が高く酸化されやすいが、この調味料では酸化臭はなく好ましい風味であったことから、高い抗酸化能も有していると推察された。

そこで、この鶏肉発酵調味料について血圧上昇抑制作用や抗酸化作用などの機能特性を調べるとともに、その強化方法の検討を次の通り行った。試験1では、調味料の機能特性についてその製造過程での変化を中心に調べた。試験2では、機能性成分として血圧降下作用⁴⁾などが知られている - アミノ酪酸（GABA）に着目し、その強化方法を検討した。

材料及び方法

1 試験1

調味料の試作及び試験方法は次のとおりであった。

(1) 調味料の試作

ア 原材料の配合

成鶏ミンチ肉450g、醤油麹（トラ醤油(株)より出麹時に入手した）225g、食塩180g、ブドウ糖90g、水690ml、酵母液（*Zygosaccharomyces rouxii*）12ml、酵素剤（試験区分の通り）であった。

イ 調味料の製造

鶏肉及び水、食塩、ブドウ糖を混合して加熱し、80℃で10分間殺菌した。40℃まで冷却した後麹及び酵母液、酵素剤を加えて良く混合し、30℃に保温しながら発酵させた。

(2) 試験区分

酵素剤の添加により次の2区を設定した。

1区 酵素剤60ml（ビオブラーゼSP-4 1.5g + デナチームAP 0.6g/100ml）

2区 酵素剤60ml（ビオブラーゼ1.5g + デナチーム 0.6g + グルタミナーゼ0.75g/100ml）

なお、ビオブラーゼSP-4及びデナチームAPはナガセケムテックス(株)製、グルタミナーゼは大和化成(株)製であった。

(3) サンプルング

発酵開始2、4、6、10週時に諸味を採取し、室温にて3000rpm、15分間遠心分離を行い、その上清を80℃10分間加熱して酵素を失活させた後、再度3000rpm15分間の遠心分離を行い、その上清を分析用サンプルとした。

(4) 分析

ア アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性

丸山の方法⁹⁾によった。使用したACEはウシ肺由来（和光純薬製）で、基質（Hip-His-Leu）はカルピオケム社製であった。サンプルは水で10倍に希釈して30μlを加えた。結果は、この希釈サンプル30μlに含まれる阻害活性を次式により%で示した。

$$\text{ACE阻害活性（％）} = \frac{E_c - E_s}{E_c - E_b} \times 100$$

E_s ：サンプルを加えたときの吸光度、 E_c ：サンプルのかわりに水を加えた吸光度、 E_b ：あらかじめ1N塩酸を加えて反応させたときの吸光度

イ DPPHラジカル消去能

小林の方法⁹⁾をもとに次のとおりHPLCで測定した。DPPH（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl）試薬はシグマ社製であった。また、標準液として - トコフェロール4.3mgをエタノール100mlに希釈し、100μM溶液とした。HPLCの条件は溶離液としてメタノール：水 = 7：3を用い、カラムはOctylカラム（C8-3、4.6×150mm、ジーエルサイエンス社製）であった。また、サンプルはエタノールで10倍に希釈し、親水性PTFE製メンブレンフィルター（0.45μm）でろ過して用いた。

ウ GABA

サンプルに等量の2%スルホサリチル酸を加え、攪拌混合後、4℃、3,000rpm、15分間遠心分離し、上清をさらに0.02N塩酸にて100倍に希釈して測定用サンプルとした。測定はアミノ酸分析計（日立製作所製835型）によった。

2 試験2

麹のGABA産生能の評価を次のとおり行った。

(1) 麹の嫌気処理

醤油用の麦麹（カツマル醤油(株)製）を真空包装し、30℃のインキュベーター内で5時間嫌気処理(処理区)し、その後、-70℃のフリーザーに移した。対照区として真空包装後、直ちに冷凍した区を設けた。

(2) GABA産生能の評価

18%の食塩水に2%の割合でL-グルタミン酸ナトリウム（和光純薬製）を溶解し基質液を調製した。基質液90mlと麹10gを加えてホモゲナイズし、これを200mlの三角フラスコに移し、30℃のウォーターバス中で振とう培養した。培養液から0、6、12時間後に2mlをサンプルングし、これに同量の2%スルホサリチル酸を加え混合した後、3,000rpm、15分間遠心分離し、その上清を水で10倍に希釈し、さらに同量の0.04N塩酸を加えて測定に供した。GABAの測定はアミノ酸分析計によった。

(3) ピリドキサルリン酸の添加

グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）の補酵素であるピリドキサルリン酸の添加効果を検討するため、上述の基質液に10mMの濃度でピリドキサルリン酸を加えて、同様にGABA産生能を評価した。

結果及び考察

1 試験1

各種タンパク質を酵素処理して得られるペプチドには血圧上昇抑制作用や抗酸化作用、抗菌作用など多岐にわたる機能特性が知られており、Saiga et al⁷⁾は、鶏肉抽出物をヒトの消化酵素で処理することにより強いACE阻害活性が発現することを報告している。図1は、試作した調味料のACE阻害活性について、発酵過程の変化を示したものである。調味料を10倍希釈した測定用サンプルでは発酵2週間で約60%の阻害活性が認められ、調味料中に抗血圧上昇作用を有するペプチドの産生が推察された。また、阻害活性に試験区による差はなく、発酵期間を通じて漸減し、10週では両区とも50%程度となった。福田ら⁸⁾は、イズミエビの酵素分解液を原料に、今回と類似した製造方法で発酵調味料を製造し、それに含まれるACE阻害活性を報告しているが、それによれば調味料を10倍に希釈した時の阻害活性は60%程度であり、酵素分解液に比較して発酵後は活性が低下し、その原因は発酵中のペプチドの分解によることを明らかにしている。

図2はGABAとその基質であるグルタミン酸 (Glu) 含量の変化を示したものである。うま味成分のアミノ酸であるGluは1及び2の両区で発酵期間を通じて増加しており、タンパク質のアミノ酸への分解が期間を通じて進行していることを示している。こうしたことより、福田らの報告と同様に鶏肉発酵調味料においてもACE阻害活性を有するペプチドの分解が発酵期間を通じて進むことにより活性が漸減したと考える。

また、GABAの基質となるGluは、グルタミナーゼを添加した2区において添加していない1区に比べて1.5倍の含量であり、発酵期間を通じて増加し10週時には12mg/mlと高い含量であった。しかしながら、GABA含量については両区とも発酵期間を通じて変化せず、同程度の含量であった。加えて、その含量も2区では10週時165 μ g/mlであり、Gluの80分の1程度の低い値であった。GABA含量の高い食品としてはギャバロン茶や発芽玄米などがよく知られおり、ギャバロン茶では乾物100g当たり150mg以上の含量が必要とされている⁹⁾。今回の調味料のGABA含量はその10分の1程度であり、調味料の塩分濃度を勘案すれば、血圧上昇抑制効果を期待するためにはさらに含量を増強する必要がある。

GABAは、基質であるGluにグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) が作用して生成される。今回の結果は、基質量が異なり増加しているにもかかわらず、それに応じたGABA含量の変化が認められなかった。このことは、何らかの影響により発酵調味料中ではGAD活性が抑制されているか、失活していると推察された。

図3に、DPPHラジカル消去能を指標とした抗酸化力の変化を示した。両区に差はなく、発酵期間を通じて増加傾向にあり、10週時には - トコフェロール (VE) に換算して約2mM相当する活性が認められた。調味料中の抗酸化成分としては、カルノシンなどのペプチドや、麹菌に由来する成分、メイラード反応生成物などが考えられる。原料に用

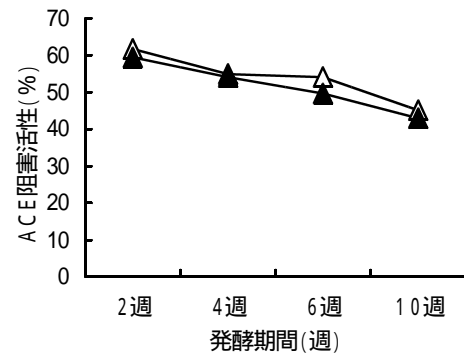


図1 発酵調味料のACE阻害活性の変化

—△— 1区 —▲— 2区

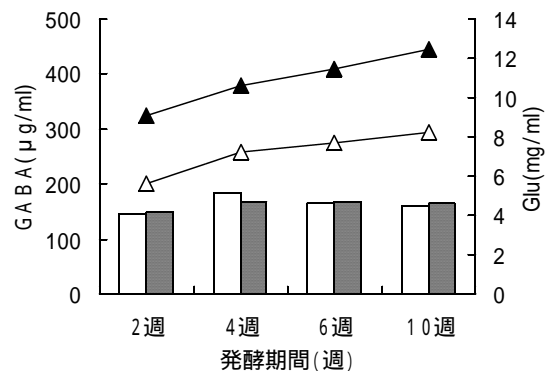


図2 発酵調味料のGABAおよびGlu含量の変化

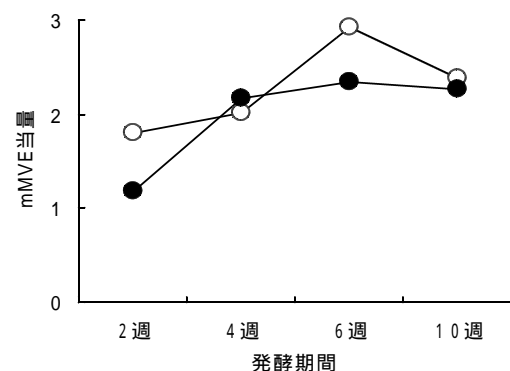
□ 1区GABA ■ 2区GABA
—△— 1区Glu —▲— 2区Glu

図3 発酵期間中の抗酸化能の変化

—○— 1区 —●— 2区

いた鶏肉には20%程度の脂肪分が含まれており、諸味の液状化とともに表面に遊離してくる。30で10週間発酵させても諸味の風味に酸化臭はなく、諸味に含まれる抗酸化成分の活性が高いことが推察される。

今回の試験は、in vitroでの機能性の評価であり、この結果は直ちにヒトの生体での効果を示すものではない。特に、ACE阻害活性のあるペプチドは、摂取後消化酵素の働きを受けるため、実際には動物実験などによりその効果を検証する必要があり、現在、高血圧自然発症ラットを用いた投与試験を進めている。

2 試験2

試験1において試作した調味料は基質となるGluに比べてGABA含量が低く、その原因としてGAD活性の低下が推察された。そこで、次の2点について検討した。第1に麴の嫌気処理で、第2にGADの補酵素であるピリドキサルリン酸の添加である。図4は、2%のGluを含む食塩水に5時間の嫌気処理を行った麴を加え、30で培養したときのGABA産生を経時的に示したものである。嫌気処理区では無処理区に比べて約3倍のGABAが培養液中に遊離した。河野ら¹⁰⁾は、各種麴を二酸化炭素で嫌気処理すると、含気処理したものに比べてGABA含量が増加することを報告している。この中で醤油麴は嫌気処理により含気処理の2.6倍に増加し、麴乾物g当たり456 μg であったという。今回は嫌気処理の方法が異なるものの、遊離したGABA含量を麴当たりで換算すると培養24時間後では約470 μg であり、河野らの報告とよく類似していた。しかし、このことは嫌気処理により麴自体のGABA含量は増加するものの、期待したような基質液中のGluのGABAへの変換が得られなかったことを示唆している。

一方、大野ら¹¹⁾は温州ミカンのGABA生成についてGADの補酵素であるピリドキサルリン酸の添加が有効であったことを報告している。そこで、基質液に1mMの濃度でピリドキサルリン酸を添加しGABA産生に与える効果を調べた(図5)。添加によりいずれの区でも培養24時間後のGABA濃度が増加し、特に、無処理区では2倍程度に上昇した。一方、嫌気処理区では無処理に比べて濃度は高いものの、ピリドキサルリン酸無添加と比べてその増加率は2割程度と低かった。

今回のGABA強化試験は、実際の仕込みを想定して食塩を添加して行ったが、培養時間が短い上、pH調整などは実施しなかった。こうしたことから、実際の仕込みでは嫌気処理の効果が異なることも考えられる。加えて、麴に含まれる他の酵素の働きが処理によって影響されることも考えられ、仕込み試験による増強効果の確認が必要である。

なお、本試験は岡山県工業技術センターと共同で実施した。

引用文献

- 1) 林利哉・伊藤肇躬(2000)：食肉の機能性．食肉の科学，41，121-126．
- 2) Okamoto A, Hanagata H, Matsumoto E, Kawamura Y, Koizumi Y, Yamagida F(1995): Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods, Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 1147-1149．
- 3) 栗木隆吉(1994)：食肉を利用した発酵調味料の開発とその特性．酪農科学・食品の研究，43，A109-A114．
- 4) 清水茂松・柴田農武夫・山口與市(1959)：-アミノ酪酸(GABA)の作用と臨床応用について(その2)．治療，41，1067-1072．
- 5) 丸山進(1996)：アンジオテンシン変換酵素阻害物質．食品中の生体機能調節物質研究法，学会出版センター，116-129．

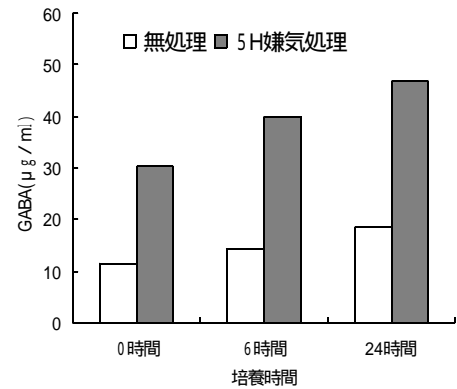


図4 麴の嫌気処理がGABA産生に及ぼす効果

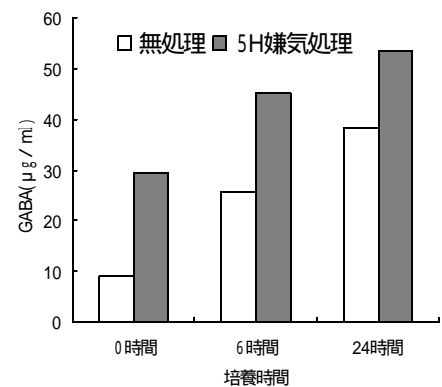


図5 麴の嫌気処理とピリドキサルリン酸の添加がGABA産生に及ぼす効果

- 6) 小林英誉(1999)：DPPHを用いたラジカル捕捉能の測定．食品の機能性評価マニュアル集，農林水産省農林水産技術会議事務局・食品総合研究所，19-20．
- 7) Saiga A, Okumura T, Makihara T, Katsuta S, Shimizu S, Yamada R, Nishimura T(2003):Angiotensin I - converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract, J Agric. Food Chem. , 51, 1741-1745 .
- 8) 福田和広・吉本亮子・新居住孝(1999)：水産資源の高付加価値化．平成8～10年度技術開発研究事業（共同研究課題「天然素材の高付加価値化技術の開発」）成果普及講習会用テキスト，徳島県工業技術センター， 1- 21 .
- 9) 堀江秀樹・澤井祐典・木幡勝則(1999)：ギャバロン茶中の - アミノ酪酸のフローインジェクション分析．日食工誌，46，494-496 .
- 10) 河野勇人(1999)：微生物変換による食品関連資源の有効利用技術の開発．平成8～10年度技術開発研究事業（共同研究課題「天然素材の高付加価値化技術の開発」）成果普及講習会用テキスト，岡山県工業技術センター， 27- 37 .
- 11) 大野一仁・首藤蒼一・門家重治(2002)：機能性成分・ギャバ付加価値化技術．平成14年度食品試験研究成績・計画概要集（公立編），独立行政法人食品総合研究所，371-372 .