

沖縄産海藻の新規利用法の開発

－アナアオサ、ヒトエグサの酵素分解による素材化－

山城利枝子・比嘉賢一・豊川哲也・鎌田靖弘

1 緒言

沖縄が属している亜熱帯の海域は、多種類の海藻が生育する海藻資源の宝庫であると同時に海藻養殖にも適している。しかし現在の沖縄の海藻利用状況を見ると、海藻生産量の95%以上をモズクが占めており、海藻資源を有効に利用しているとは言い難い。また、海藻の加工状況は塩蔵や乾燥などの1次加工が主体であり、付加価値の高い加工品はあまり見られないのが現状である。

そこでこの研究では、海藻の高付加価値化と用途拡大を図るために、養殖による大量生産が可能な海藻の軟化または液化による新素材を開発するとともに、海藻の有用成分の検索と分画を行い、新素材を活用し海藻の機能性を付加した食品の開発および利用法について検討する。

平成12年度は、海藻新素材開発として、緑藻（アナアオサ、ヒトエグサ）の酵素分解による液化およびペースト化の検討と、近海海藻について幾つかの機能性スクリーニングを行った。

ここでは海藻の酵素分解による素材開発について報告する。

2 実験方法

2-1 海藻の酵素分解による液化

原料海藻：アナアオサ（*Ulva* sp. 沖縄県水産試験場で養殖）

使用酵素製剤を表1に示す。

2-1-1 アナアオサの酵素分解法

アナアオサは、水洗いしてゴミ等の夾雑物を除去した後、フードプロセッサーで粉碎し、ペースト状にした。ペーストに同量の水を加え、塩酸でpHを調整した後、酵素を所定量添加し40℃で4時間搅拌しながら酵素分解を行った。分解終了後、酵素を熱失活させ、遠心分離または吸引ろ過で分解液と残渣に分離した。残渣の乾燥重量から分解率を算出し、さらに分解液中の糖量やタンパク質量を分析した。酵素分解方法をスキーム1に示す。

2-1-2 アナアオサペーストの水分測定

水分は、アルミニウムはく法¹⁾で測定した。

2-1-3 分解率の算出

アナアオサペーストの固形物量（水分を引いた値）と酵素分解後の残渣の乾燥重量から、以下の式により分解率を算出した。

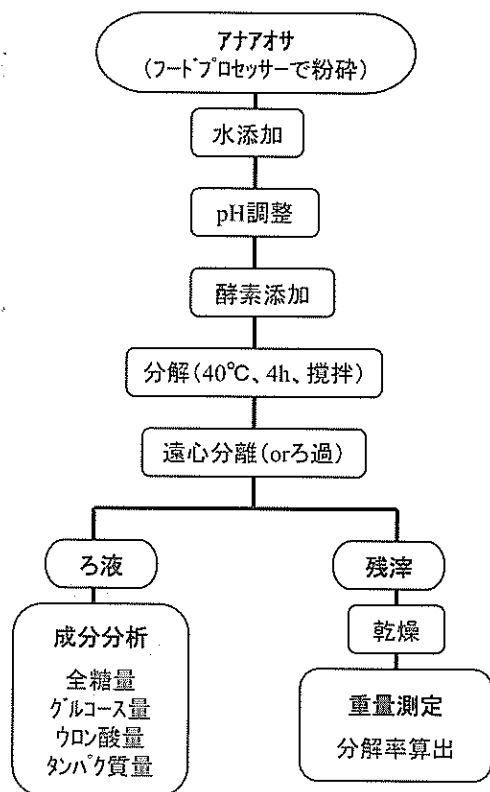
$$\text{分解率(\%)} = \frac{\text{ペーストの固形物量(g)} - \text{残渣の乾燥重量(g)}}{\text{ペーストの固形物量(g)}} \times 100$$

2-1-4 全糖量測定

グルコースを標準物質として、フェノール硫酸法²⁾で測定した。

表1 使用酵素剤

種類	酵素名	至適温度	至適pH	起源	製造元
セルラーゼ	セルレーズナガセ	50	4~4.5	<i>Aspergillus niger</i>	ナガセケムテックス(株)
	セルラーゼXL-531	50	4~4.5	<i>Aspergillus niger</i>	
	セルラーゼXP-425	50	5	<i>Trichoderma viride</i>	
	セルロシンAC40	50	4.5	<i>Aspergillus niger</i>	阪急バイオインダストリー(株)
ペクチナーゼ	ペクチナーゼナガセ	50	4~4.5	<i>Aspergillus niger</i>	ナガセケムテックス(株)
複合酵素	XP-415	55	3	<i>Rhizopus delemar</i>	
キシリナーゼ	セルロシンHC100	50	4	<i>Aspergillus niger</i>	阪急バイオインダストリー(株)
	セルロシンTP25	60	5	<i>Trichoderma viride</i>	
マンナーゼ	セルロシンGM5	75	5	<i>Aspergillus niger</i>	
プロテアーゼ	プロテアーゼMアマノ	50	4.5	<i>Aspergillus oryzae</i>	天野製薬(株)



スキーム1 アナアオサの液化(酵素分解)法

2-1-5 グルコース量測定

グルコースの測定は、市販のグルコースCIIテストワコー（和光純薬工業株式会社製）を使用した。

2-1-6 ウロン酸量測定

グルクロン酸を標準物質として、カルバゾール硫酸法²⁾で測定した。

2-1-7 タンパク質量測定

ケルダール法により、タンパク質定量装置（KJEL-AUTO 三田村理研工業(株)）で測定した。

2-1-8 アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性の測定

ACE阻害活性は、Cushmanらの方法³⁾に準じて測定した。基質として、Hippuryl L-histidyl L-leucineを用い608mM塩化ナトリウムを含むホウ酸緩衝液（pH8.3）に基質濃度が7.6mMとなるように溶解した。ACE（Sigma）はウサギ肺アセトンパウダー由来のものを用い、上記ホウ酸緩衝液に67U/mlとなるように溶解した。ACE阻害活性は遊離した馬尿酸量をHPLCシステムで測定し、コントロール（蒸留水）との生成比を求めACE阻害活性（%）とした。

2-2 海藻のペースト化

原料海藻：ヒトエグサ（*Monostroma nitidum* 北中城村漁業協同組合で養殖）

使用酵素：セルレーズナガセ、セルロシンAC40

ジューサーで粗く粉砕したヒトエグサに水を20%(w/w)加え、至適pHに調整後、酵素を0.4%添加し、10°Cで所定時間攪拌してペースト化を行った。

2-2-1 ペーストの粘度測定

所定時間毎にヒトエグサペーストを採取し、スパイラル粘度計（PL-1TL（株）マルコム社製）で測定した。

〈測定条件〉 サンプル温度：25°C

ローター回転数：50rpm

3 実験結果および考察

3-1 各種酵素によるアナアオサの分解率

海藻を液化するには、海藻の骨格を形成する多糖類を分解することが必要である。海藻の骨格を形成している多糖類¹⁾は、主にセルロースであり、そのほかにキシランやマンナンがある。そこで、セルラーゼやキシラナーゼなどの糖分解酵素を用いてアナアオサの酵素分解を行い、各種酵素による分解率の比較を行った。酵素は、表1に示したセルラーゼ製剤4種、キシラナーゼ製剤2種、マンナーゼ製剤1種、ペクチナーゼ製剤1種、複合酵素1種を使用し、アナアオサペーストに対して0.4%添加して4時間酵素分解を行った。図1に各種酵素によるアナアオサの分解率を示した。

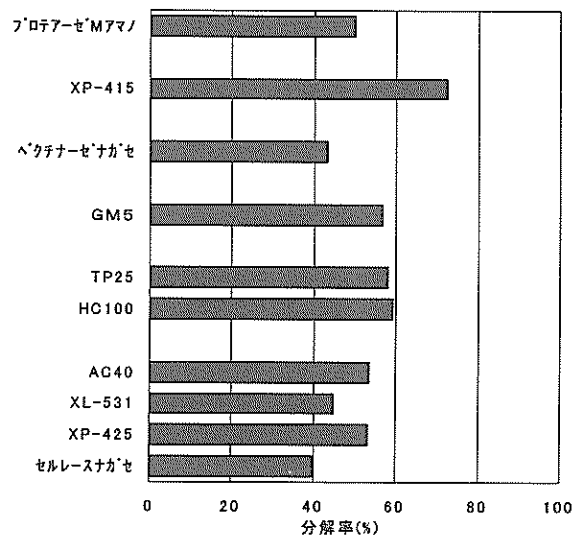


図1 各種酵素によるアナアオサの酵素分解
酵素量：0.4%、分解時間：4時間

セルラーゼ製剤は40%以上の分解率でアナアオサを分解し、その中でもセルラーゼXP-425およびセルロシンA

C40が分解率53%と高かった。キシラナーゼ製剤およびマンナーゼ製剤による分解率は57~59%であった。また、複合酵素であるXP-415による分解率は72.5%であり、他の酵素での分解率よりも高い値であった。これは、XP-415がプロテアーゼを主体とする複合酵素であることから、海藻の細胞壁にあるとされる糖蛋白質がプロテアーゼの作用で分解され、その結果、糖分解酵素による細胞壁の分解も進行したのではないかと推測される。また、タンパク質分解酵素剤であるプロテアーゼMアミノによるアナアオサの分解率は50%と低かったことから、複数の酵素が共存することで海藻の分解が促進されたと考えられる。

3-2 酵素の組合せによるアナアオサの分解

3-1の結果において、複合酵素XP-415での分解率が高かったことから、複数の酵素を組み合わせると、アナアオサの分解率を高めることができると予想される。そこで、数種の酵素を併用した酵素分解による分解率を調べた。また、分解液中の全糖量、グルコース量、ウロン酸量およびタンパク質量の変化も測定した。

酵素は、XP-415、セルラーゼXP-425、セルロシンHC100、セルロシンGM5、プロテアーゼMアミノを使用し、酵素の組合せは①XP-415+XP-425+HC100+GM5、②XP-415+XP-425、③XP-415+Mアミノの3通りを設定した。結果を図2に示す。尚、図中の酵素量は、酵素1種類当たりの添加量である。

各酵素の組合せとも、単独で酵素を使用するときよりも分解率は高く80%まで達しており、数種の酵素を組み合わせることは、海藻の酵素分解に有効であることがわかる。しかし、酵素量が増加しても分解率の上昇はあまり認められなかった。酵素分解液中の全糖量は7~8 mg/ml、グルコース量は2~3mg/ml、ウロン酸量は1~3mg/ml、タンパク質量は1~2mg/mlであり、酵素量が増加してもあまり変化していなかった。

また、アナアオサの酵素分解に適した酵素の組合せを選定するために、単位酵素(100mg)当たりのグルコース生成量とタンパク質生成量を算出した。結果を図3に示した。

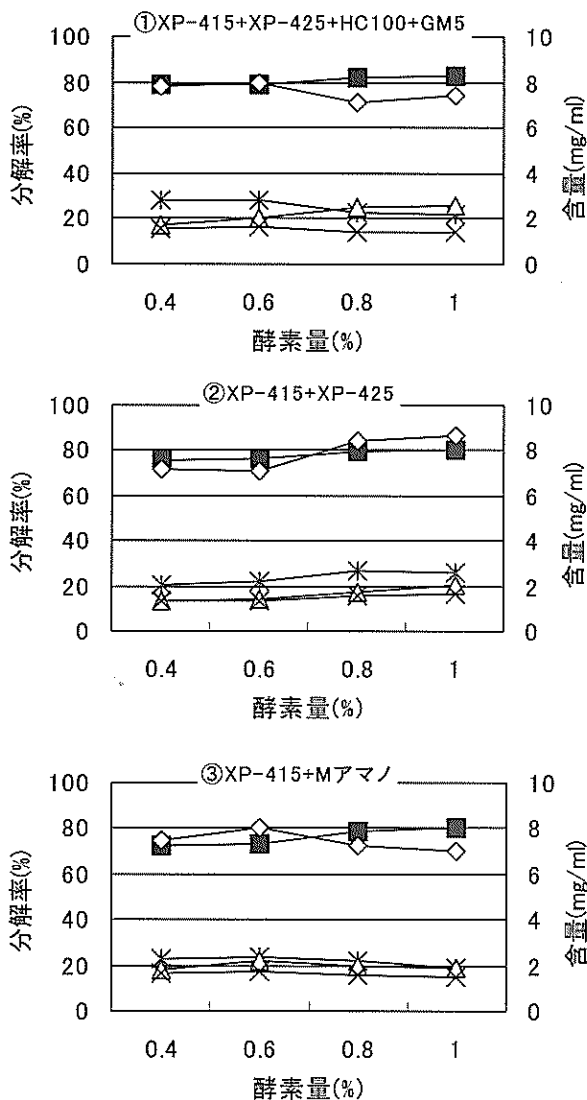


図2 酵素の組合せによるアナアオサの酵素分解

分解温度：40℃、分解時間：4時間

■— 分解率 ◇— 全糖量 *— グルコース量
 △— ウロン酸量 ×— タンパク質量

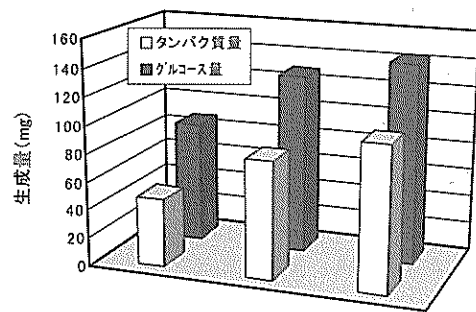


図3 単位酵素(100mg)当たりのグルコースとタンパク質の生成量

酵素量：0.4%、分解温度：40℃、分解時間：4時間

アナアオサの酵素分解液は、食品素材としてより利用しやすくするために、今後発酵処理を行う予定であるが、グルコースはその際に栄養源として必要な成分である。また、タンパク質は海藻の変敗や不快臭の原因となる成分である。よって、アナアオサの酵素分解には、グルコースが多く生成し、タンパク質の生成量が少ない酵素が適している。

単位酵素当たりのグルコースの生成量はXP-415+XP-425では120mg、XP-415+Mアマノでは140mgであったのに対して、XP-415+XP-425+HC100+GM5では80mgとかなり少なかった。よってグルコース生成量から、XP-415+XP-425およびXP-415+Mアマノの酵素の組合せを選定した。さらに、グルコースとタンパク質の生成量を、XP-415+Mアマノでの生成量に対するXP-415+XP-425での生成量で比較すると、グルコースは90%、タンパク質は80%の生成量となっており、タンパク質の生成割合がより少なくなっている。この研究では、アナアオサの酵素分解には変敗や不快臭の原因となるタンパク質の生成がより少ない分解条件が好ましいと考え、酵素の組合せはXP-415+XP-425が最適であると決定した。

3-3 アナアオサ酵素分解液の(ACE)阻害活性

食品としてほとんど利用されていないアナアオサを、食品素材としての用途を開発するために酵素分解による液化を検討してきた。そこで、アナアオサの酵素分解液の付加価値をさらに高めることを目的に、血圧上昇を抑制するとして注目されているACE阻害活性の評価を行った。結果を表2に示した。

表2 アナアオサ酵素分解液のACE阻害活性とアミノ酸量

酵素名	阻害活性(%)	アミノ窒素(mg)
XP-415+プロテアーゼ	-1.9(活性なし)	29.9
XP-415+XP425	41.9	12.0
XP415+XP425+HC100+GM5	48.9	17.6
アナアオサ水抽出物	2.5	-

アナアオサのXP-415+Mアマノによる酵素分解液にはACE阻害活性が認められなかったが、XP-415+XP-425では阻害活性が42%、XP-415+XP-425+HC100+GM5では49%の阻害活性が認められた。また、酵素処理を行っていないアナアオサの水抽出物の活性は2.5%と低い値であった。酵素分解液にACE阻害活性が認められたのは、使用した酵素に含まれるプロテアーゼにより、アナアオサのタンパク質がペプチドに分解されたためと考えられる。XP-415+Mアマノによる酵素分解液に阻害活性が認められなかったのは、Mアマノが強力なプロテアーゼであるため、タンパク質がペプチドからさらにアミノ酸にまで分解されたためではないかと考えられる。そこで、酵素分解液中のアミノ窒素量を測定したところ、XP-415+Mアマノによる酵素分解液では29.9mgと高い値を示し、タンパク質がアミノ酸にまで分解されていることが示唆された。

このように、使用する酵素や分解条件を選択することにより、アナアオサ酵素分解液にACE阻害活性を付与することが可能であった。

3-4 ヒトエグサのペースト化

ヒトエグサを40~50℃に長時間放置しておくと、茶色に変色することから、ヒトエグサの鮮やかな緑色を残すために、ペースト化の温度は10℃に設定した。また、ペースト化に使用する酵素は、至適温度以下の温度での相対活性低下の割合が低いことから、セルレースナガセおよびセルロシンAC40を用いた。

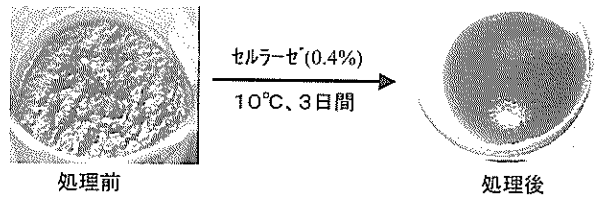


図4 ヒトエグサの酵素処理による性状変化

図4は、ヒトエグサを10℃で3日間セルラーゼ処理したときの性状の変化を示したものである。きめの粗いペーストが微細化され、きめの細かいペーストに変化しているのがわかる。さらに、図5に示したように、酵素処理によりペーストの粘度も低下し、よりなめらかなペーストとなっている。また、酵素処理後には海藻臭が低下していたことから、食品用素材として利用しやすいヒトエグサペーストとなっていた。

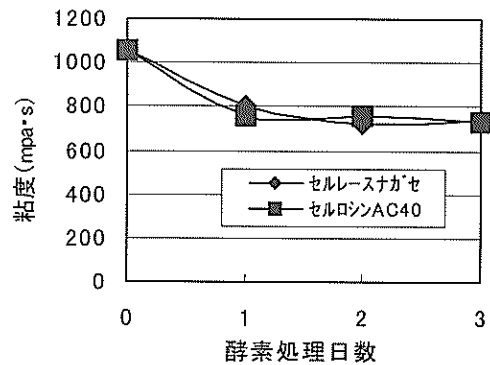


図5 ヒトエグサの酵素処理に伴う粘度変化
試料温度：25℃、ローター回転数：50rpm

4. 結言

海藻の食品新素材の開発を目的に、アナアオサおよびヒトエグサを原料として、酵素分解による液化およびペースト化を検討したところ、次のような結果が得られた。

- ①数種の酵素を組み合わせることにより、70%以上の分解率でアナアオサを分解し、液化することができた。
- ②アナアオサの液化に使用する酵素は、酵素分解液のグルコース量およびタンパク質量などから、XP-415（複合酵素）＋XP-425（セルラーゼ）の組み合わせを選定した。
- ③10℃でヒトエグサに酵素を作用させることにより、ヒトエグサの緑色を保持し、なめらかで香りの良いペーストを作ることが可能であった。

これらの結果をもとに、今後はアナアオサ酵素分解液の発酵処理を行い、酵素分解液の風味改善を検討し、海藻の液化およびペースト化素材の用途開発を行う。

謝辞

この研究は、農林水産庁の新技术地域実用化研究促進事業により実施したものである。

この研究を行うに当たり、海藻を提供していただきました沖縄県水産試験場および北中城村漁業協同組合ならびに、酵素を提供していただきましたナガセケムテックス㈱および、阪急バイオインダストリー㈱に御礼申し上げます。

5. 参考文献

- 1) 日本食品工業界食品分析法編集委員会編 食品分析法 光琳 (1992)
- 2) 福井作蔵 還元糖の定量法 学会出版センター (1978)
- 3) Cushman, D.W. and Cheung, H.S., *Biochem. Pharmacol.*, 20, 1637 (1971)
- 4) 山田信夫 海藻利用の科学 成山堂書店 (2000)
- 5) 西澤一俊、千原光雄編 藻類研究法 共立出版 (1992)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。