

# 嚥下困難者用食品の創生を志向した、 ゲル化しにくい魚肉すり身の物性制御

日本大学 生物資源科学部  
山口 勇将

## 1. 研究の目的と背景

近年、社会の高齢化に伴い、咀嚼・嚥下が困難な高齢者が増加している。咀嚼・嚥下が困難になると食事の楽しさといった生活の質 (QOL) が低下するだけでなく、食欲が低下し栄養障害が起こる。特に、タンパク質やエネルギーの欠乏により起こる protein energy malnutrition (PEM) では、免疫能の低下、易感染性、薬物の副作用出現などがみられるほか、転帰が不良になりやすい<sup>1)</sup>。咀嚼・嚥下困難者がタンパク質を十分に摂取するには、咀嚼や嚥下の困難度に応じた“ソフト”な食品が求められる。

魚介類はアミノ酸スコアが高い良質なタンパク質源である。魚介類の消費量は年々低下しているものの、高齢者は肉類よりも魚介類を好む傾向がある。咀嚼・嚥下困難者は、食塊としてまとまりにくい食品、口蓋でつぶしにくい食品、付着性の高い食品などを食することが難しい。このため、生魚は口蓋でつぶしにくく、焼き魚は食塊としてまとまりにくいいため、咀嚼・嚥下困難者には食しづらい。かまぼこ等の練り製品は、密度が均一で食塊を形成しやすいが、凝集性が高く、嚥下しにくい。また、大半がスケソウダラを原料として用いているため、味や物性のバリエーションが低い。これは、他の多くの魚では内在性のプロテアーゼ活性が強く、タンパク質の分解によりゲル形成が困難であるためである。したがって、内在性プロテアーゼの働きを制御できれば、様々な魚を用いて物性を調節したゲルを作製し、誤嚥しにくい魚肉練り製品を開発することが可能となる。

筆者は、脱脂された亜麻仁残渣の水溶性画分にプロテアーゼインヒビターが含まれることを明らかにしている。本研究では、亜麻仁由来のプロテアーゼインヒビターを用いて魚肉中のプロテアーゼ活性を制御し、咀嚼・嚥下が困難な高齢者でも安心して食することのできる魚肉練り製品を創生できうるか検討した。まず、抽出した亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの食品利用に向けた特性 (熱耐性、pH 耐性、塩耐性) を確認した後、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターをすり身に添加し、加熱して得られたゲルの評価を行った。すり身の加熱によるゲル化は一般的に2段階の加熱によって行われる。まず、30℃付近での加熱により、内在性のトランスグルタミナーゼが働き、魚肉の主要タンパク質であるミオシン重鎖 (MHC) のグルタ

ミン残基とリシン残基によって分子間架橋が形成される。この中～低温での加熱操作を坐りといい、加熱ゲルの弾力性が強化される。続いて80℃付近で加熱することで強固なゲルが形成されるが、温度上昇の際に50～60℃付近で内在性のプロテアーゼが働き、MHCが分解されゲルの脆弱化を招き、最悪の場合はゲルが形成されない。これを戻るといい、戻りの制御がゲル形成において重要である。本研究では、加熱ゲルのMHC量から亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターによる戻りの抑制効果を評価した。

## 2. 研究の方法

### 2-1. 実験材料

脱脂された亜麻仁粉末はNOW Foods社 (Bloomingdale, IL, USA) のOrganic Golden Flax Seed Mealを使用した。魚肉すり身はアルゼンチン産の泰安号ホキFAOを用い、使用まで-80℃にて保存した。

### 2-2. 亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの抽出

脱脂された亜麻仁粉末に20倍重量の1.0 M NaCl溶液を加え、恒温槽を用い25℃の条件で1時間攪拌した。その後、高速冷却遠心機にて遠心分離 (10000 g, 20 min, 4℃)、上清を回収した。得られた上清に30%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、攪拌した。再び遠心分離 (10000 g, 20 min, 4℃)、上清に65%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、4℃で一晩攪拌した。翌日、遠心分離 (10000 g, 30 min, 4℃)、沈殿を回収した。得られた沈殿を純水に対して分画分子量3500の透析膜を使用し透析した。透析チューブ内の溶液を高速冷却遠心機にて遠心分離 (10000 g, 30 min, 4℃)、上清を凍結乾燥し亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターとした。抽出された亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターは使用するまで室温 (22-26℃) で保管した。亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターのタンパク質含有率はBCA法にて求めた。

### 2-3. プロテアーゼ阻害活性測定

プロテアーゼ阻害活性測定はCoscuetaらの方法3を参考に一部修正を加えて行った。一定の温度およびpHも

しくは塩濃度で処理した亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターを一定の濃度になるよう純水に溶解し、これをウシ膵臓由来トリプシン溶液と混合させた。その後、37℃で30分間インキュベートした後、トリプシンの合成基質である N $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide hydrochloride 溶液を加えて、37℃で10分間酵素反応を行った。2.0 M 酢酸水溶液を加え酵素反応を停止し、酵素反応により生成した p-nitroaniline の吸収波長である 405 nm における吸光度をマルチプレートリーダーにて測定した。トリプシン阻害活性は、亜麻仁タンパク質を含まない時のトリプシンに対する、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターを加えた時のトリプシン活性の比率として、以下の式を用いて算出した。

$$\text{トリプシン阻害率 (\%)} = (1 - (A - B)/(C - D)) \times 100$$

A: トリプシン活性 (+)、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビター (+)

B: トリプシン活性 (-)、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビター (+)

C: トリプシン活性 (+)、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビター (-)

D: トリプシン活性 (-)、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビター (-)

#### 2-4. 魚肉ゲルの作製

-80℃で保存してあった魚肉すり身を4℃の冷蔵庫内で一晩かけて解凍した。解凍したすり身を1 cm 角にカットし、すり身10 gを乳鉢と乳棒を用いて約4分間混合した(荒摺り)。次に、水3 mL加えて約2分間乳棒と乳鉢を用いて混ぜた(水伸ばし)。亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターは0.1 gを水伸ばしの工程で加えた。続いて、食塩を325 mg加えて約4分間乳棒と乳鉢を用いて混ぜ(塩摺り)、肉糊を調製した。以上の混合は全て4℃以下で行った。調製した肉糊をポリ袋に充填し、恒温水槽で加熱して魚肉ゲルを得た。

#### 2-5. 魚肉ゲルの評価

魚肉ゲルにおけるミオシン重鎖(MHC)の量をSDS-PAGEにより解析した。作製したすり身加熱ゲルと、尿素、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、メルカプトエタノール、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、1M HClからなるタンパク質溶解液3.75 mLを試験管内で混合し、2分間沸騰水中で加熱した。冷却後、試験管内にスターラーを入れ試料と溶解液を一晩攪拌した。ゲルが完全に溶解したことが確認できたら、サンプル500  $\mu$ Lを1.5 mLのエペンドルフチューブに移し卓上遠心機で遠心分離を行った。その後、中層からサンプルを200  $\mu$ L抽出し、SDS、グリセロール、Tris-HCl、メルカプトエタノール、CBB、純水からなるサンプル調製液を50  $\mu$ L加え、1分間沸騰水中で加熱し、これをサンプルとした。サンプルは3-10%

のポリアクリルアミドゲルにアプライし、250 Vの定電圧で110分間泳動を行った。電気泳動したゲルは染色および脱色し、Chemi Doc MP (バイオ・ラッド ラボラトリーズ、東京)にて撮影した。

### 3. 研究内容と実施経過

#### 3-1. 亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの抽出

得られた亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターのタンパク質含有率は82%であり、また、トリプシン阻害率は5 mg/mLの濃度においては97%だった(図1)。亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの特性評価は5 mg/mL以上の濃度で行った。

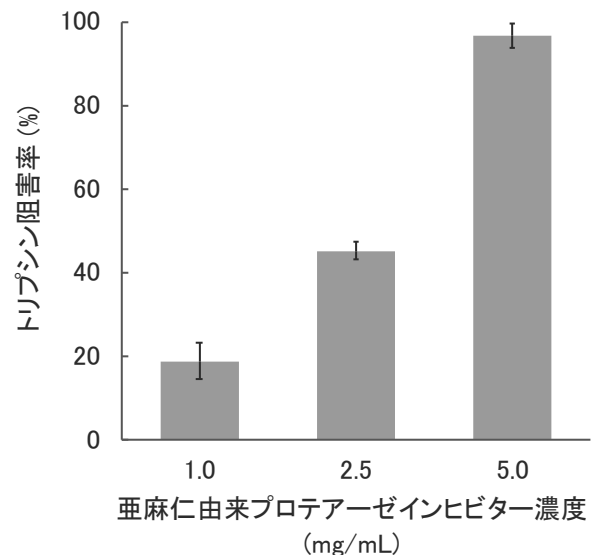


図1. 亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの各濃度におけるトリプシン阻害率 (n = 5, mean  $\pm$  S.D.)

#### 3-2. 亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの食品利用に向けた特性評価

亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの食品利用に向けた特性評価として熱耐性、pH耐性および塩耐性を調べた。亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターを25℃から100℃までの一定温度間で加熱した後トリプシン阻害率を測定したところ、60℃まではトリプシン阻害率に影響を与えなかった一方、80℃以上では阻害率の低下が見られた(図2)。80℃以上の加熱では亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターが変性して失活するものと考えられる。魚肉ゲルの物性制御においては、魚肉内在性プロテアーゼが作用する50~60℃付近で亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの活性が落ちないため、魚肉ゲルの物性制御に利用可能であることが示された。また、2段階加熱の80℃付近での加熱により亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの活性

が失われるため、食す際には生体への影響を抑えることができるかと期待される。

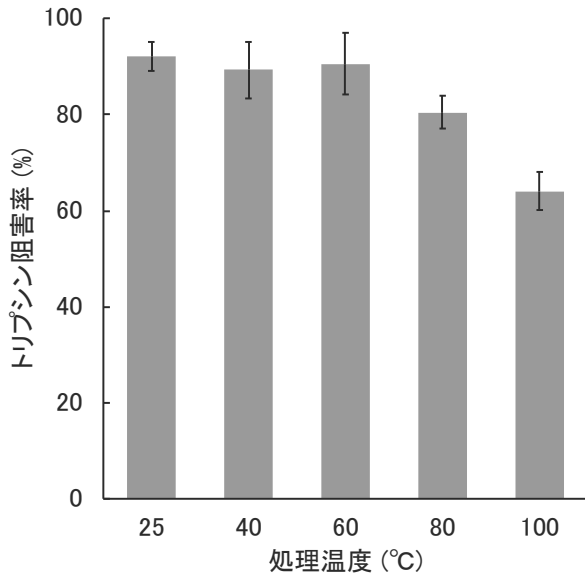


図 2. 各温度で処理した後の亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターのトリプシン阻害率 (n = 5, mean ± S.D.)

亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターを各 pH の溶液中で処理した後にトリプシン阻害率を測定したところ、pH が 1 のときはトリプシン阻害率の低下が見られたものの、多くの食品の pH である 3 から 8 においては阻害率の低下が見られなかった (図 3)。死後の魚肉の pH は魚類により異なるもののおよそ 5 から 6 であり、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターは魚肉中の pH においても活性が損なわれないことが示された。

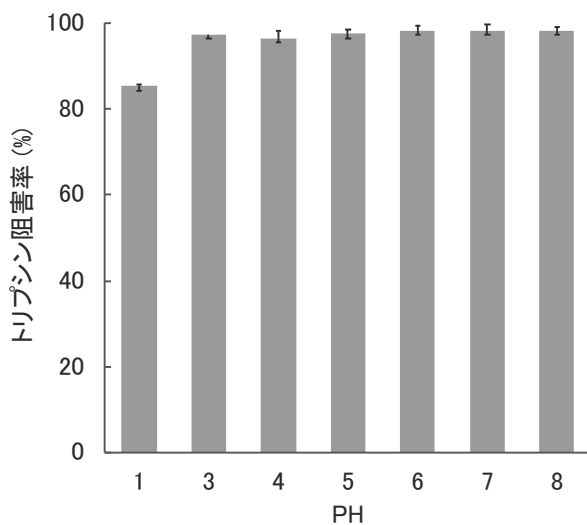


図 3. 各 pH で処理した後の亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターのトリプシン阻害率 (n = 5, mean ± S.D.)

亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターを各 NaCl 濃度の溶液においてトリプシン阻害率を測定したところ、どの濃度においても阻害率に影響を与えなかった (図 4)。魚肉ゲル作成における魚肉すり身中の NaCl 濃度は 3-5% ほどであり、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターは魚肉すり身中でも活性を失わないことが示唆された。

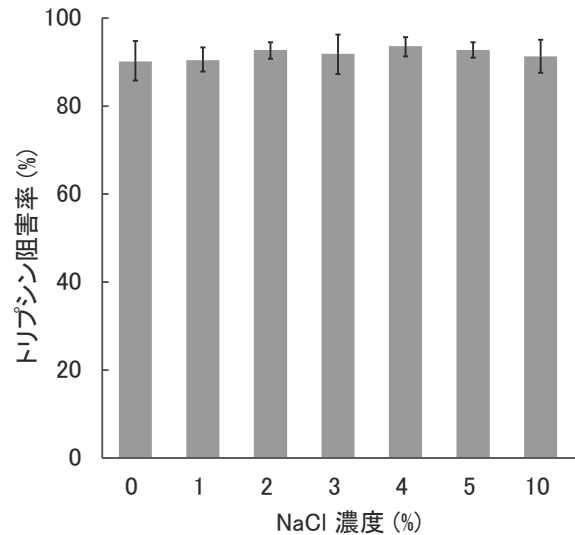


図 4. 各 NaCl 濃度における亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターのトリプシン阻害率 (n = 5)

以上の結果から、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターは魚肉ゲル作成の過程でも活性を失わず、物性制御に適した性質を有していることがわかった。

### 3-3. 亜麻仁由来プロテアーゼインヒビター添加魚肉ゲルの特性評価

魚肉すり身に亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターを添加し加熱すると魚肉ゲルが得られた (写真 1)。魚肉ゲルの物性に最も寄与しているとされる MHC について、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの効果を評価した。ホキのすり身に各濃度の亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターを添加し 60 °C で 40 分間加熱し、得られたゲル中の MHC 量を SDS-PAGE により評価した (図 5, 6)。亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターを 1.0% 以上添加すると MHC のバンド強度が大きくなり、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターによって内在性のプロテアーゼを阻害し、MHC の分解を防ぐことができたこと示唆された。データは本報に示していないが、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターの添加によりゲルの破断強度が増加したようであった。以上より、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターはホキのすり身のゲル化において、内在性のプロテアーゼを阻害し物性を改善しうることが示唆された。



写真1. 得られた魚肉ゲルの様子

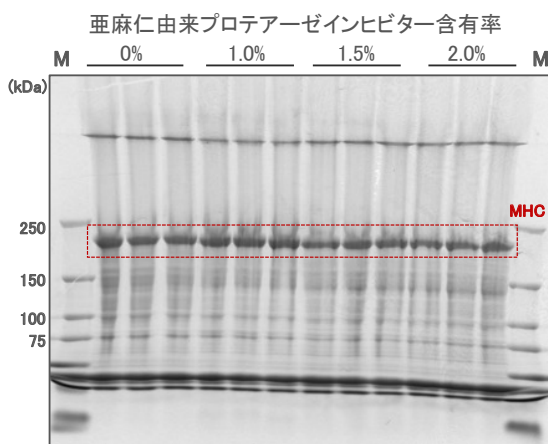


図5. 魚肉ゲルの SDS-PAGE

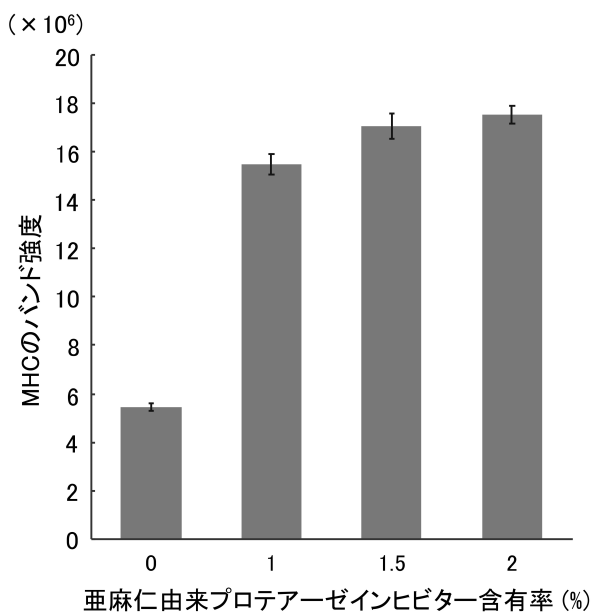


図6. 亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターが魚肉ゲル中のMHCに与える影響

#### 4. 残された問題、今後の課題

亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターはホキすり身のゲル化における物性制御に貢献しうることが示唆された。しかしながら、それが嚥下困難者用食品に適するものなのかについて、本研究では十分な知見を得ることができなかった。今後は、亜麻仁由来プロテアーゼインヒビターを含有する様々な魚肉すり身をゲル化および物性評価し、さらには官能試験も行いながら嚥下困難者用食品に相応しいゲルを引き続き作成していく。

#### 5. 謝辞

本研究は（公財）東洋食品研究所の2020年度研究助成を受けて実施されました。本研究を遂行するにあたり多大なるご支援を賜りました（公財）東洋食品研究所ならびに関係の皆様へ厚く御礼申し上げます。また、魚肉ゲル作成のご指導をいただきました、日本大学生物資源科学部の福島英登教授にも厚く御礼申し上げます。

#### 6. 参考文献

- Hudson, Heather. M.; Daubert, Christopher. R.; Mills, Russell. H. The interdependency of protein-energy malnutrition, aging, and dysphagia. *Dysphagia*. 2000, **15**(1), p. 31-38. doi:10.1007/s004559910007.
- Yamada, Koki; Kajita, Takayuki; Matsumiya, Masahiro; Fukushima, Hideto. Evaluation of the quality of frozen surimi using suwari reaction speed and activation energy. *CyTA - J. Food*. 2018, **16**(1), p. 723-729. doi:10.1080/19476337.2018.1460402.
- Coscueta, Ezequiel R.; Pintado, Manuela E.; Picó, Guillermo A.; Knobel, Gastón; Boschetti, Carlos E.; Malpiedi, Luciana, Pellegrini; Nerli, Bibiana, B. Continuous method to determine the trypsin inhibitor activity in soybean flour. *Food chem*. 2017, **214**(1), p. 156-161. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.056.