

味噌漬カツオ肉と漬味噌におけるタンパク質および遊離アミノ酸の変動とプロテアーゼ活性について

Changes with curing of Protein, Free Amino Acids and Protease Activity in Misozuke Skipjack and Miso

山崎 歌織*[§] 外西 壽鶴子** 御木 英昌***
 kaori Yamazaki Suzuko Hokanishi Hidemasa Miki

The freshness of skipjack meat rapidly deteriorates, and skipjack cured in mugi-miso is therefore popularly used in Kyushu in order to preserve the quality and retain the taste. In this study, a chemical analysis of protein was conducted on skipjack meat cured in miso (called misozuke skipjack) and on miso itself. The degradation of several proteins in the misozuke skipjack and the elution of some proteins from misozuke skipjack into miso were observed by SDS-PAGE. Most of the free amino acid contents in misozuke skipjack increased during the curing period. It was also found that aspartic protease and serine protease were present in miso by measuring the protease activity and the effect of protein inhibitors. Although protease activity was not detected in skipjack meat that had not been cured in miso, protease activity at optimal pH 7 was detected in misozuke skipjack meat. Misozuke skipjack cured for 10 days demonstrated a maximum protease activity which was inhibited by the serine protease inhibitor, AEBSF.

キーワード：カツオ Skipjack；麦味噌 Mugi-miso；プロテアーゼ Protease；SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 SDS Gel Electrophoresis；遊離アミノ酸 Free Amino Acid

緒言

カツオは鮮度低下が速く、加熱により肉質が顕著に硬くなることが知られている。その改善のために、著者らは九州一円で一般的に使用されている麦味噌を用いてカツオ肉を味噌漬処理することにより、カツオ肉の保存性の向上、即ち保存期間の延長を試みた¹⁾。また、官能評価により好ましい味噌漬期間を調べた結果、味噌漬 10 日間のカツオ肉が最も好まれた。さらに、味噌漬処理後の美味しい状態で保存期間を延長するために、味噌漬 10 日後に味噌を除去し 7 日間の凍結保存を行った。その結果、味噌漬 10 日間のカツオ肉とほとんど差異は認められず、官能評価および物性値、さらに骨格筋細胞の形態は維持され、冷凍保存が役立つことが明らかになった¹⁾。また、米味噌（白、赤）や豆味噌を用いて味噌漬したブリの脂質におよぼす味噌の抗酸化性や、味噌漬による魚肉タンパク質の低分子化について既に報告している²⁾。

魚肉の味噌漬については、バショウカジキを味噌漬しその期間の硬さの変化³⁾やカマスサワラ肉の味噌漬処理にお

けるテクスチャーとタンパク質の変化⁴⁾、さらにサワラやアマダイを西京味噌に漬けた場合の成分の動態について^{5,6)}の報告があるが、その要因に関する報告は少ない。

味噌や納豆は、発酵過程においてプロテアーゼによりそれ自体のタンパク質が分解され、ペプチドやアミノ酸が生成することが報告されている^{7,8)}。味噌漬により、魚肉タンパク質に変化が起り、魚肉の旨味増加や物性の変化が味噌漬魚肉独特の美味しさに大きく影響すると考えられる。

本実験では、味噌漬によるカツオ肉と漬味噌のタンパク質および遊離アミノ酸の変動について調べた。さらに、それらに関する要因の一つに、味噌やカツオ肉中のタンパク質加水分解酵素による作用があると考え、両者のプロテアーゼ活性、さらにその特性をプロテアーゼ阻害剤を用いて調べたので報告する。

実験方法

1. 実験材料

カツオは四割りにした背側ロインの凍結品（枕崎市漁業協同組合、枕崎市かつお公社：南太平洋産 1 本釣り船上凍結カツオ）約 500 g のものを入手し、実験まで -20℃ で冷凍保存した。

味噌は、麦すり味噌（以下、味噌と略記：キンコー醤油（株）製）を用いた。味噌の成分は水分約 46%、塩分 10.5% で pH は約 5.0 であった。

* 鹿児島女子短期大学
 (Kagoshima Women's Junior College)

** 元鹿児島女子短期大学
 (Kagoshima Women's Junior College)

*** 鹿児島大学
 (Kagoshima University)

[§] 連絡先 鹿児島女子短期大学
 〒 890-8565 鹿児島市紫原 1-59-1
 TEL 099(254)9193 内線 227 FAX 099(254)5914

2. 試料調製

カツオ背側ロインは5℃冷蔵庫で中心部最終温度が-2℃になるまで約9時間空気解凍後、筋繊維に垂直に切断し、厚さ1.5 cm、重量20±1 gに調製した。これを無処理カツオ肉とした。味噌漬処理は、無処理カツオ肉と同量の味噌で周囲を覆い、味噌漬カツオ肉とした。それぞれの試料の包装は食品包装用ラップフィルム(15×12 cm)に一切ずつ包み、温度は5℃でステンレス製バット(28.5×20×2 cm)に並べ30日間まで保存した。味噌漬カツオ肉は、5℃冷蔵庫で0, 3, 10, 20, 30日間保存後、カツオ肉周囲の余分な味噌や水分を拭き取り、漬味噌および味噌漬カツオ肉を実験に用いた。また、対照として無処理カツオ肉も同様の期間保存を行った。また、凍結処理は-20℃で行い、味噌漬10日間の味噌漬カツオ肉から味噌を除去後、7日間凍結保存した試料を味噌漬後凍結カツオ肉とした。

凍結試料の解凍操作は、5℃冷蔵庫で90分間空気解凍後、室温に30分間放置して行った。

加熱カツオ肉は、生カツオ肉をコンベックオーブン(RCK 10 E-10, リンナイ(株)製)で200℃5分間加熱し(中心温度70℃以上)、硬さの測定に用いた。

3. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(以下、SDS-PAGEと略記)に従い分析を行った。既成ゲルは、E-T 520 L 5~20% グラディエントゲルとSPU-15 S 15% 均一ゲル(アトー株式会社製)の2種類を使用し、染色はクマーシーブリリアントブルーを用いた。泳動試料は、0.01 M リン酸緩衝液(NaCl含む, pH 7.6)でホモジナイズ後同量の試料処理液(最終濃度:ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)1%, 2-メルカプトエタノール1%, 50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 6.8), グリセリン20%)を混合し100℃2分間加熱処理した。最終濃度をカツオ肉は0.5% (W/V)、味噌は2.5% (W/V)になるように調製し、試料は20 μl ずつ添加した。

4. プロテアーゼ活性および阻害剤

木村ら⁹⁾の方法に従い、カゼインを基質としてプロテアーゼ活性を測定した。味噌は蒸留水、カツオ肉は0.1 M リン酸緩衝液(リン酸二水素カリウム-リン酸一水素ナトリウム pH 7.6)を用いて、それぞれ最終濃度が20% (W/V)、10% (W/V)になるようにホモジナイズした。最終濃度0.5% (V/V)になるようにTritonX-100を添加し、氷水中で10分間緩やかに攪拌を行い、その後3,000 rpmで8℃10分間遠心分離(MODEL CD-100 R TOMY SEIKO)し、得られた上清を用いた。プロテアーゼ活性は、40℃で60分間に1 μgのチロシン相当量の呈色を示す活性を1単位とし、mgタンパク質量当たりで表した。また、各測定と同時に、Lowry-Folin法¹⁰⁾に従い、タンパク質の定量を行った。結果は、各試料につき3~6回行った平

均値を示した。

プロテアーゼ活性の阻害剤は、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤のPepstatin Aおよびセリンプロテアーゼ阻害剤のフツ化4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニル塩酸塩(以下、AEBSFと略記)を用い、pH 3およびpH 7におけるプロテアーゼ活性の阻害効果を調べた。阻害剤添加濃度は、反応液容量に対する濃度(W/V%)とした。

5. 硬さの測定

無処理カツオ肉および味噌漬カツオ肉の硬さは、クリープメータ(山電製, RE-3305)を用いて室温で測定した。

無処理カツオ肉と味噌漬カツオ肉をそれぞれ30分間室温(約25℃)に放置し、内部温度が一定になってから測定に用いた。また、加熱カツオ肉は加熱後30分間室温で放冷し内部温度が安定してから測定を行った。

測定条件は、円柱状プランジャー径3 mm、試料台速度1 mm/s、運動回数2回、歪率は各試料の高さの70%に設定した。各試料につき3~6切のカツオ肉を用い、プランジャーが筋節間を貫入するように試料を置き、1切のカツオ肉につき3箇所測定しその平均値を求めた。

6. 遊離アミノ酸およびヒスタミンの定量

遊離アミノ酸は、遊離アミノ酸抽出法¹¹⁾に従って行った。試料(10 g)を水でホモジナイズし、5% (W/V) スルホサリチル酸を加えて室温で1時間放置後、3,000×g、5分間遠心分離し得られた上清をpH 2.0に調整、遠心分離、ろ過して100 mlに定容した液を分析試料溶液とした。これを高速液体クロマトグラフ法(カラム:Wakosil PTC φ4.0 mm×200 mm 和光純薬工業(株)、カラム温度:40℃、流量:1.0 ml/min、検出:UV 254 nm、注入量:10 μl)で測定した。溶離液には、A液(PTC-amino acids mobile phase A:WAKO)とB液(PTC-amino acids mobile phase B:WAKO)を用いた。溶離液の構成は、B液の比率を0-20分:0-70%、20-22分:70-100%、22-27分:100%、27-29分:100-0%、29-40分:0%とした。

この成分分析は、JA 鹿児島県経済連に依頼し、2~3回行った平均値を示した。

遊離ヒスチジンに関しては、上記および下記の方法により測定した。

遊離ヒスチジンは、試料を10% (W/V) スルホサリチル酸溶液で振とうし、定容、ろ過後に希釈して分析試料溶液とした。これにニンヒドリン試薬を用いて、アミノ酸自動分析法(機種:L-8800形高速アミノ酸分析計(株)日立製作所、カラム:日立カスタムイオン交換樹脂φ4.6 mm×60 mm(株)日立製作所、移動相:L-8500 PF 緩衝液、反応液:ニンヒドリン試薬)で測定した。

ヒスタミンは、高速液体クロマトグラフによる定量¹²⁾(一部変法)に従って行った。試料は、0.2 mol/l 過塩素酸、0.01% (W/V) オクタメチレンジアミン溶液およびヘキササンでホモジナイズ後、遠心分離、定容、ろ過を行った。その

味噌漬カツオ肉と漬味噌におけるタンパク質および遊離アミノ酸の変動とプロテアーゼ活性について

ろ液に30% (W/V) 炭酸ナトリウム溶液, 1% (W/V) ダンシルクロライドーアセトン溶液を混合し, 37°C で一夜放置後ヘキサンで抽出, 濃縮乾固しエタノールを加えて分析試料溶液とした。これを高速液体クロマトグラフ法(機種: LC-10 AS (株)島津製作所, 検出器: 紫外可視分光光度形 SPD-10 Avp (株)島津製作所, カラム: YMC-Pack ODS-A A-312 ϕ 6.0 mm \times 150 mm (株)ワイエムシイ, 移動相: アセトニトリルーメタノールー10 mM 酢酸 (2:3:2 V/V/V), 流量: 1.0 ml/min, カラム温度: 45°C) で測定した。

遊離ヒスチジンとヒスタミンの成分分析は, 日本食品分析センターに依頼し, 2~4 回行った平均値を示した。

結果および考察

1. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

無処理カツオ肉と味噌漬後の味噌漬カツオ肉および漬味噌について, SDS-PAGE 分析によりタンパク質の泳動パターンの変動を調べた (図1)。無処理カツオ肉に検出された約 500~700 kDa の高分子タンパク質成分が味噌漬期間の経過に従い, 少しずつ分解された。さらに, 約 200 kDa のタンパク質成分と約 60 kDa のタンパク質成分は, 味噌漬 20 日間でそのほとんどが分解された。漬込み前の味噌において検出されなかった約 22~95 kDa のタンパク質成分のバンドは, 約 60 kDa のタンパク質成分を除いて, 味噌漬 3 日後以降の漬味噌に検出された。漬味噌に検出されたこれらのタンパク質成分のバンドは, カツオ肉において検出されたタンパク質成分のバンドと移動度がほぼ一致した。この結果から, カツオ肉のタンパク質が味噌へ移行したのではないかと考えられた。カツオ肉のタンパク質の中には, 分子量の大きさに関係なく味噌漬処理により味噌へ溶出されやすいタンパク質と溶出されにくいタンパク質があることが示唆された。これは, タンパク質の形状や性

状または細胞のどこに局在しているのかに影響されるのではないかと推測された。例えば, 細胞の局在が影響している場合, 細胞膜にある表在性タンパク質や可溶性画分 (細胞質) に局在しているタンパク質などは逸脱しやすいのではないかと考えられた。尚, 約 200 kDa のタンパク質成分のバンドは筋肉の主要なタンパク質であるミオシンではないかと推察された。このタンパク質は味噌へは溶出されにくく, 味噌漬により分解されやすいことが推測された。

味噌漬カツオ肉の美味しい状態で保存期間を延長する方法として, 味噌漬後凍結保存することを前報¹⁾で報告した。凍結保存の結果, 味噌漬後凍結処理の前後において骨格筋細胞の形態が良好に保持されていたことが判明した¹⁾。今回の SDS-PAGE によるタンパク質の解析から, 図 2 に示すように, 味噌漬 10 日後と味噌漬 10 日後に味噌を外して 7 日間凍結させたカツオ肉のタンパク質の泳動パターンはほぼ一致することが明らかになった。既に報告¹⁾した組織化学的解析の結果と同様に, 味噌漬後 7 日間の凍結保存の有効性が再確認された。

2. プロテアーゼ活性

タンパク質の分解に関与するプロテアーゼ活性を, 漬味噌と味噌漬カツオ肉において調べた。

図 3 に味噌漬期間 0 日に相当する漬込み前の味噌と無処理カツオ肉および 10~30 日間味噌漬したカツオ肉の漬味噌と味噌漬カツオ肉について, 各々の pH (pH 3, 5, 7, 8) におけるプロテアーゼ活性を示した。漬込み前 (0 日) の味噌のプロテアーゼ活性は, pH 3 での活性が最も高く, pH 5, 7 において減少し, pH 8 ではほとんど活性は無かった。一方, 無処理カツオ肉には pH 3, 5, 7, 8 ではほとんど活性は無かった。次に, 漬味噌はいずれの味噌漬期間の漬味噌においても漬込み前の味噌と同様の傾向がみられた。pH 3 におけるプロテアーゼ活性は, 味噌漬 10 日間の漬味噌で漬込み前の味噌と同等に高く, 味噌漬 20, 30 日間の

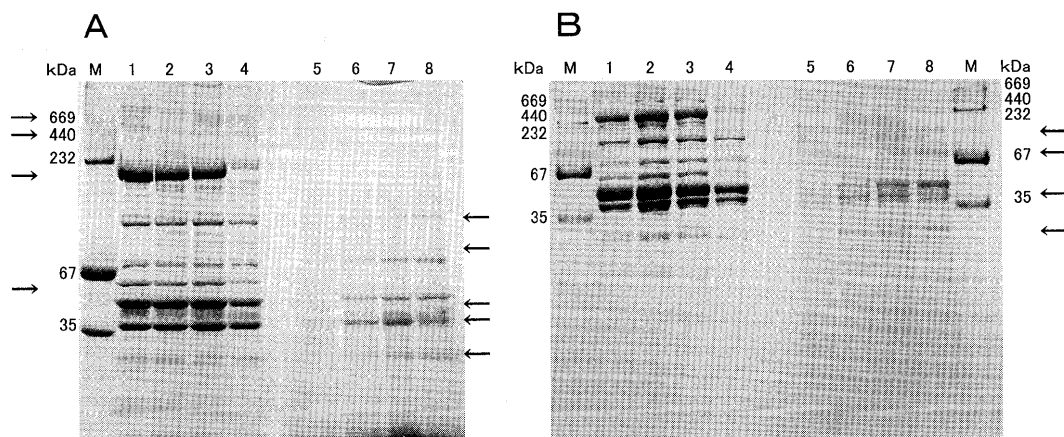


図 1. 味噌漬カツオ肉および漬味噌の電気泳動像

A: 5~20% グラディエントゲル, B: 15% 均一ゲル

M: 分子量マーカー, 1: 無処理カツオ肉, 2: 味噌漬 3 日カツオ肉, 3: 味噌漬 10 日カツオ肉, 4: 味噌漬 20 日カツオ肉, 5: 味噌 (漬込み前), 6: 漬味噌 3 日, 7: 漬味噌 10 日, 8: 漬味噌 20 日

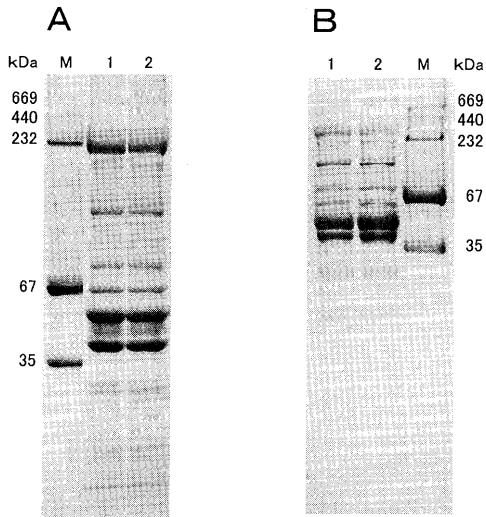


図2. 味噌漬カツオ肉および味噌漬後凍結カツオ肉の電気泳動像
 A: 5~20% グラディエントゲル
 B: 15% 均一ゲル
 M: 分子量マーカー, 1: 味噌漬10日カツオ肉, 2: 味噌漬10日後凍結7日カツオ肉

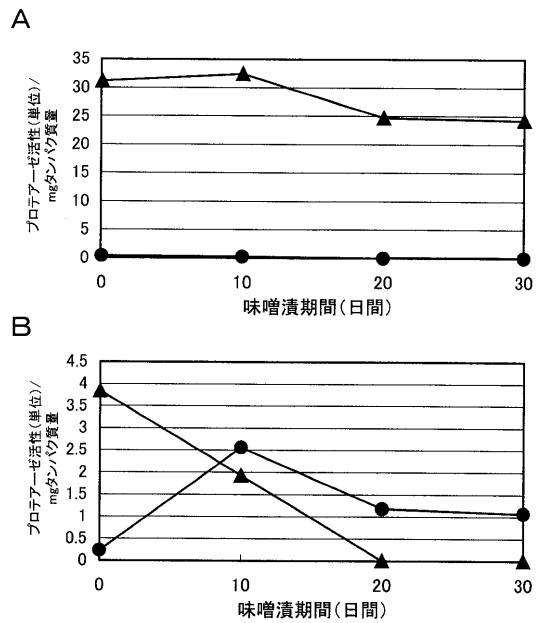


図4. 味噌漬期間におけるプロテアーゼ活性の変動
 A: pH 3, B: pH 7, ▲: 漬味噌, ●: 味噌漬カツオ肉

漬味噌では活性が減少した。一方、味噌漬カツオ肉は、味噌漬10日間のカツオ肉のpH7におけるプロテアーゼ活性が最も高かった。以上の結果から、漬味噌ではpH3におけるプロテアーゼ活性が、味噌漬カツオ肉ではpH7におけるプロテアーゼ活性が最も高いことが明らかになった。

図4に示すように、pH3における漬味噌のプロテアーゼ活性は味噌漬10日間をピークに味噌漬20, 30日間と保存期間が長くなるに従い、活性は減少する傾向にあった。一方、味噌漬カツオ肉は味噌漬期間の経過に関わらず、pH3に活性のあるプロテアーゼはほとんど検出されなかった。

pH7における漬味噌のプロテアーゼ活性はpH3における活性に比べると僅かであり、味噌漬期間の経過と共に減少し、味噌漬20, 30日間では活性が無くなった。一方、カツオ肉は味噌漬によりpH7におけるプロテアーゼ活性が増加し、味噌漬10日間の値が最も高くなった。その後、20, 30日間と減少した。無処理カツオ肉と味噌漬カツオ肉のpHは約5.7であるので、味噌漬によりカツオ肉に検出されたpH7に活性があるプロテアーゼは、味噌漬カツオ肉の分解に関与している可能性は非常に低いと推測された。味噌漬10日間のカツオ肉に検出されたプロテアーゼ活性値は、味噌漬10日間の漬味噌の活性値とほぼ同じであった。無処理カツオ肉で検出されなかったプロテアーゼ活性が味噌漬をすることにより検出された理由は現在のところ明らかではない。味噌中の成分により活性化されたのか、あるいは味噌のプロテアーゼがカツオ肉に緩慢に移行したのかもしれない。また、その他の要因があるのかもしれないと考えられた。

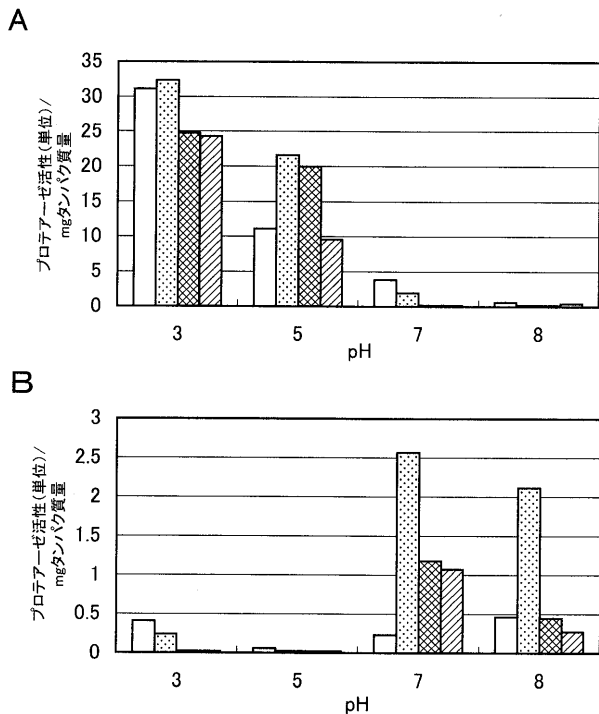


図3. 味噌漬期間における漬味噌および味噌漬カツオ肉のプロテアーゼ活性
 pH3: 0.1M 乳酸-乳酸ナトリウム緩衝液, pH5: 0.1M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液, pH7, 8: 0.1M リン酸緩衝液
 A: 漬味噌, B: 味噌漬カツオ肉, □: 0日 (漬込み前), ▨: 10日, ▩: 20日, ▪: 30日

味噌漬カツオ肉と漬味噌におけるタンパク質および遊離アミノ酸の変動とプロテアーゼ活性について

さらに、漬込み前の味噌および漬味噌の pH はそれぞれ約 5.0 と約 5.6 であった。従って、味噌漬カツオ肉のタンパク質の分解には、pH 5.6 付近に活性があるプロテアーゼの触媒作用によるのではないかと推測された。

3. プロテアーゼ活性阻害

漬味噌は pH 3、味噌漬カツオ肉は pH 7 においてプロテアーゼ活性が高いことが明らかになった。これらの pH 3 および pH 7 において活性があるプロテアーゼの種類を同定するために、アスパラギン酸プロテアーゼ（酸性プロテアーゼ）の阻害剤である PepstatinA とセリンプロテアーゼ（中性プロテアーゼ）の阻害剤である AEBSF をそれぞれ用いて、プロテアーゼ活性の阻害効果を調べた（図 5, 6）。

漬味噌については、活性の高い pH 3 における味噌漬期間ごとのプロテアーゼ活性割合と阻害剤添加濃度の変化による阻害効果を図 5 に示した。アスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤である PepstatinA による阻害効果は高く、いずれの味噌漬期間においても、阻害剤添加濃度の増加に伴い阻害効果が現れた。得に、PepstatinA 0.2% 濃度の添加で、活性は 100% 阻害された。さらに、セリンプロテアーゼの阻害剤である AEBSF によりいずれの味噌漬期間においても漬味噌のプロテアーゼ活性は阻害された。

味噌漬カツオ肉については、活性のある pH 7 における阻害効果を、プロテアーゼ活性が最も高かった味噌漬 10 日間のカツオ肉において調べた（図 6）。セリンプロテアーゼの阻害剤である AEBSF 0.05% 濃度添加において、活性は完全に阻害された。一方、アスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤である PepstatinA 0.05% 濃度の添加においては、全く阻害されなかった。

4. カツオ肉の硬さの変化

味噌中のプロテアーゼが味噌漬カツオ肉に作用し、カツオ肉の硬さに変化をおよぼしていると考えられたため、クリープメータによる硬さの測定を行った（図 7）。

生の無処理カツオ肉および味噌漬カツオ肉の硬さは、30 日間でほとんど変動がなかった。無処理カツオ肉および味噌漬カツオ肉は、加熱処理により未加熱の場合と比較するといずれの味噌漬期間においても硬さの値は高くなった。畑江ら¹³⁾も、カツオのように生肉が軟らかい魚肉は加熱により硬くなる傾向にあると報告している。味噌漬カツオ肉は無処理カツオ肉に比べて味噌漬 10 日後をピークに硬くなり、その後 20, 30 日間には加熱処理した無処理カツオ肉とほぼ同じ値に軟化した。この現象は、図 1 の電気泳動像の味噌漬 20 日間のカツオ肉タンパク質の低分子化と一致した。

5. 遊離アミノ酸の定量

タンパク質の変動およびプロテアーゼ活性の変動がどのように遊離アミノ酸量に変化をおよぼしているかを検討するために、漬味噌と味噌漬カツオ肉の遊離アミノ酸量を調べた（表 1）。漬味噌と味噌漬カツオ肉の必須アミノ酸の

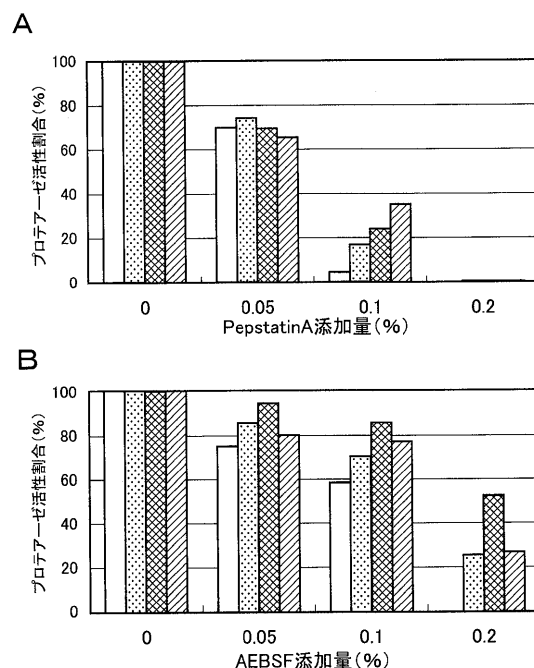


図 5. pH 3 における漬味噌のプロテアーゼ活性阻害

A: Pepstatin A, B: AEBSF

□ 0 日 (漬込み前), ▨ 10 日, ▩ 20 日, ▧ 30 日

プロテアーゼ活性割合は、阻害剤添加量 0% 時のプロテアーゼ活性を 100% として表した

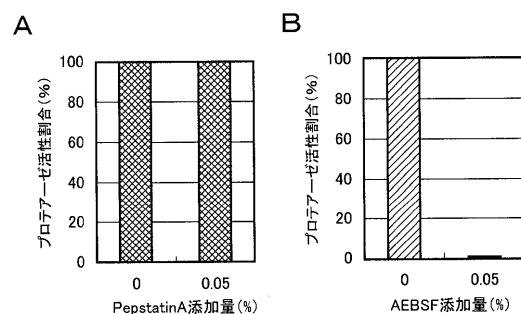


図 6. pH 7 における味噌漬 10 日カツオ肉のプロテアーゼ活性阻害

A: PepstatinA, B: AEBSF

プロテアーゼ活性割合は、阻害剤添加量 0% 時のプロテアーゼ活性を 100% として表した

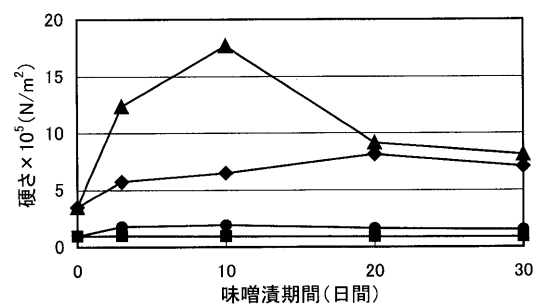


図 7. 味噌漬期間によるカツオ肉の硬さの変化

▲: 味噌漬カツオ肉 (加熱), ◆: 無処理カツオ肉 (加熱), ●: 味噌漬カツオ肉 (未加熱), ■: 無処理カツオ肉 (未加熱)

表 1. 漬味噌および味噌漬カツオ肉中の遊離アミノ酸の経時変化

	漬味噌 (mg/100 g)				味噌漬カツオ肉 (mg/100 g)				総量(漬味噌+味噌漬カツオ肉) (mg/200 g)				
	0日	10日	20日	30日	0日	10日	20日	30日	0日	10日	20日	30日	
必須 ア ミノ 酸	Thr	25.8	31.9	27.2	35.0	N. D	23.5	23.2	35.8	25.8	55.4	50.4	70.8
	Val	34.8	40.8	26.8	36.1	5.4	32.2	25.2	36.0	40.2	73.0	52.0	72.1
	Met	15.8	18.6	16.9	25.0	4.8	15.7	16.2	25.2	20.6	34.3	33.1	50.2
	Ile	33.3	33.8	25.1	34.3	2.6	29.7	24.4	35.4	35.9	63.5	49.5	69.7
	Leu	62.5	64.5	46.5	64.7	4.1	54.3	43.3	67.8	66.6	118.8	89.8	132.5
	Phe	35.9	39.9	25.7	36.9	2.3	32.9	25.0	36.4	38.2	72.8	50.7	73.3
	Lys	26.2	28.8	21.8	33.8	7.0	18.5	20.0	35.2	33.2	47.3	41.8	69.0
	His	12.9	188.0	222.5	235.5	1,026.0	157.6	185.6	250.4	1,038.9	345.6	408.1	485.9
Glu	112.7	52.1	96.9	126.3	5.1	35.6	59.7	113.0	117.8	87.7	156.6	239.3	

N. D 検出せず

うちスレオニンや筋肉タンパク質に多い分枝アミノ酸のバリン、イソロイシン、ロイシンと芳香族アミノ酸のフェニルアラニンは、味噌漬10日後に増加し20日後にやや減少、30日後には再び増加する傾向がみられた。これらの遊離アミノ酸量の変動は、味噌に多く含有されている遊離アミノ酸が味噌漬期間10日間で急激にカツオ肉へ移行し、その後30日間で両者の遊離アミノ酸量は平衡状態に達する傾向にあった。遊離アミノ酸量が20日後にやや減少し30日後に増加する理由については明確ではない。しかし、前報¹⁾で報告しているように、味噌漬カツオ肉の30日間の重量変動は、味噌漬3日後まで急激に減少し、その後重量は増加に転じ20、30日後には試料調製時(0日)の重量とほぼ同じになった。従って、味噌漬20日後に遊離アミノ酸量が減少する理由は、味噌漬によるカツオ肉の脱水によるとは考えにくい。

旨味を呈する酸性アミノ酸のグルタミン酸は、元来味噌に多く含まれるアミノ酸である。味噌漬により10日後の漬味噌中の遊離グルタミン酸量は急激に減少し、味噌漬カツオ肉の遊離グルタミン酸量は増加した。これは、漬味噌中の遊離グルタミン酸がカツオ肉へ移行したためと考えられる。さらに、味噌漬20、30日間に両者の遊離グルタミン酸量はそれぞれ増加し、味噌漬30日間で漬味噌と味噌漬カツオ肉の遊離グルタミン酸量は平衡状態になった。この遊離グルタミン酸が味噌漬カツオ肉の美味しさに大いに影響をおよぼしていることが示唆された。

一方、赤身魚肉に多い¹⁴⁾遊離ヒスチジンは、カツオ肉に顕著に多く、味噌漬により10日間で急激に減少し、同時に漬味噌中の遊離ヒスチジン量は顕著に増加した。これより、無処理カツオ肉に多く含まれる遊離ヒスチジンは、味噌漬にすることで漬味噌へ移行することが明らかになった。ヒスチジンは、必須アミノ酸として重要なアミノ酸であるが、ヒスチジンデカルボキシラーゼにより脱炭酸されヒスタミンへ変換されると、アレルギー疾患者にとってはアレルギー症状を悪化させる可能性がある。そこで、漬味

表 2. 漬味噌および味噌漬カツオ肉中の遊離ヒスチジンとヒスタミンの経時変化

	(mg/100 g)	
	遊離ヒスチジン	ヒスタミン
漬味噌 0日(漬込み前)	38	0.9
漬味噌 10日	803	N. D
漬味噌 20日	—	0.9
漬味噌 30日	—	1.0
味噌漬 0日カツオ肉(無処理)	1,720	N. D
味噌漬 10日カツオ肉	906	0.6
味噌漬 20日カツオ肉	—	0.8
味噌漬 30日カツオ肉	—	0.9

N. D 検出せず

噌および味噌漬カツオ肉中の遊離ヒスチジンとヒスタミン量を定量し、結果を表2に示した。味噌漬カツオ肉のヒスタミン量の増加は全くみられず、ごく少量検出されたヒスタミンは、元々味噌に含まれていたものがカツオ肉へ移行したものと考えられた。従って、味噌漬30日間の保存においては、ヒスチジンからヒスタミンへ変換されないことが分かった。

要 約

前報¹⁾に引き続き、鮮度低下の速いカツオ肉の保存性を高め美味しさを保持する調理法として、生カツオ肉の味噌漬を行った。本実験は、漬味噌と味噌漬カツオ肉の両者のタンパク質および遊離アミノ酸の変動を調べた。また、漬味噌および味噌漬カツオ肉におけるプロテアーゼ活性を調べた。さらに、漬味噌および味噌漬カツオ肉に検出されたプロテアーゼの種類を同定を試みた。

1. カツオ肉を味噌漬することにより、カツオ肉タンパク質のSDS-PAGEのパターンは変化し、特定のタンパク質の低分子化が認められた。また、カツオ肉から漬味噌へ溶出するタンパク質が確認された。
2. 味噌漬カツオ肉と味噌漬後凍結カツオ肉のタンパク質

味噌漬カツオ肉と漬味噌におけるタンパク質および遊離アミノ酸の変動とプロテアーゼ活性について

の泳動パターンは、ほぼ一致した。味噌漬後凍結保存は、保存期間の延長に有効な方法であることが再度確認された。

3. 味噌および漬味噌は、pH 3におけるプロテアーゼ活性が最も高かった。無処理カツオ肉のプロテアーゼ活性は、各々のpHにおいて極めて低い活性であった。しかし、味噌漬カツオ肉のプロテアーゼ活性は、pH 7において味噌漬10日間が最も高かった。味噌漬カツオ肉には、pH 3におけるプロテアーゼ活性は検出されなかった。
4. アスパラギン酸プロテアーゼとセリンプロテアーゼのそれぞれの阻害剤、PepstatinAとAEBSFを使用し、阻害効果を調べた結果、味噌にはアスパラギン酸プロテアーゼとセリンプロテアーゼが作用していることが判明した。味噌漬カツオ肉中に検出されたプロテアーゼは、阻害効果からセリンプロテアーゼであることが分かった。
5. 味噌漬カツオ肉の硬さは、味噌漬10日間が最も硬くなり、その後20、30日間と急激に軟化した。この急激な軟化は、タンパク質の低分子化の結果と一致した。
6. 味噌漬カツオ肉のヒスチジン以外の必須アミノ酸と遊離グルタミン酸量は、味噌漬期間に伴い増加傾向にあった。一方、カツオ肉に多く含有する遊離ヒスチジンは漬味噌へ移行するために減少傾向であった。

本研究にあたり凍結カツオ肉をご提供下さいました、枕崎市漁業協同組合および、麦味噌をご提供下さいました、キンコー醤油株式会社に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 山崎歌織, 外西壽鶴子, 御木英昌 (2005), 味噌漬カツオ

肉の保存の延長と美味しさの保持について, 日調科誌, **38**, 473-479

- 2) 山崎歌織, 河村フジ子 (1997), 味噌の種類が味噌漬け魚肉の品質に及ぼす影響, 日調科誌, **30**, 122-126
- 3) 下村道子, 下坂智恵, 山崎清子 (1994), 魚肉のみそ漬における硬さの変化, 家政誌, **35**, 611-619
- 4) 下村道子, 高橋ユリア, 吉松籐子, 松本重一郎 (1987), カマスサワラ肉の味噌漬処理におけるテクスチャーとタンパク質の変化, 家政誌, **38**, 13-21
- 5) 伊東清枝, 新井映子, 福家真也 (1987), サワラの味噌漬けに関する研究—漬け込み期間中の含窒素成分の動態について—, 家政誌, **38**, 267-273
- 6) 新井映子, 伊東清枝 (1985), アカアマダイ味噌漬け中における遊離アミノ酸の動態について, 東京学大紀要, **37**, 147-152
- 7) 竹内徳男, 稲荷妙子, 森本仁美, 毛利光之 (2004), 味噌のDPPHラジカル補足能に関する研究, 岐阜女子大紀要, **33**, 115-122
- 8) 河村幸雄, 大久保一良 (1999), ダイズのヘルシーテクノロジー, pp.147, 光琳
- 9) 木村友子, 加賀谷みえ子, 福谷洋子 (1992), 鶏肝臓味噌漬の性状と嗜好に及ぼす各種味噌の影響, 日調科誌, **25**, 110-117
- 10) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275
- 11) 日本食品工業学会・食品分析法編集委員会編 (1981), 食品分析法, pp.494-495, 光琳
- 12) 日本薬学会編, 衛生試験法・注解 2005, pp.180-182, 金原出版株式会社
- 13) 畑江敬子, 飛松聡子, 竹山まゆみ, 松本重一郎 (1986), 魚肉の物性とその魚種差に対する結合組織の寄与, 日水誌, **52**, 2001-2007
- 14) 須山三千三, 吉沢由紀男 (1973), 回遊性魚類の筋肉の遊離アミノ酸組成, 日水誌, **39**, 1339-1343

(平成19年10月17日受付, 平成20年3月31日受理)

和文抄録

鮮度低下の速いカツオ肉の保存性を高め美味しさを保持するための試みとして、本研究は九州一円で使用されている麦味噌を用いてカツオ肉を味噌漬し、味噌漬中タンパク質の性質の変化を調べた。

カツオ肉を味噌漬することにより、SDS-PAGE解析の結果、味噌漬カツオ肉には分解されやすいタンパク質、また味噌へ溶出しやすいタンパク質があることが判明した。また、多くの種類の遊離アミノ酸量は味噌漬期間に伴い味噌漬カツオ肉において増加する傾向にあった。さらに、漬味噌および味噌漬カツオ肉のプロテアーゼ活性と阻害効果を調べたところ、味噌にはアスパラギン酸プロテアーゼとセリンプロテアーゼが含まれていることが示唆された。無処理カツオ肉にはプロテアーゼ活性はほとんど検出されなかった。しかし、興味あることにはカツオ肉を味噌漬することによりpH 7におけるプロテアーゼ活性が検出された。このプロテアーゼは味噌漬期間10日間で最大活性を示し、セリンプロテアーゼの阻害剤であるAEBSFで阻害された。