

食肉タンパク質におよぼすイチジク果実プロテアーゼの基本的性状

孫 成春・泉本 勝利・宮本 拓・宮瀬こころ

(応用動物機能学)

Fundamental Properties of Fig Protease on Meat Protein

Chengchun Sun, Masatoshi Izumimoto, Taku Miyamoto
and Kokoro Miyase

(Department of Animal Science)

The fundamental properties of fig protease on meat protein were determined and the possibility of meat tenderization by this proteolytic enzyme was examined. The amount of liberated peptide from the meat protein increased until one hour of reaction time and became almost constant after that. Fig protease activity was held by freezing at -80°C for 7 months. The activities were a little different in 0-8% of salt concentration. On the pH dependency, though activity was higher in the neutral range at pH 6-7 than acidic range, it was almost constant. Optimum temperature was found in high temperature at $80-90^{\circ}\text{C}$. Activity was inhibited with N-ethylmaleimide. The activity of fig 1g was equivalent to the protease of Taka-diazyme 10mg. No bitterness was recognized in the meat after treatment with fig homogenate.

Key words : fig protease, meat tenderization, salt, pH, temperature

緒 言

食肉の嗜好的品质はさまざまな要因によって決定されるが、なかでも軟らかさなどのテクスチャーは最も重要な因子のひとつである。硬い肉を軟らかくするために、テンドラーライザーなどで物理的に軟らかくされている。また、硬さの原因となる筋肉タンパク質をプロテアーゼ処理によって化学的に脆弱化させることが試みられている。パパイヤ、パイナップル、キウイフルーツ、イチジクなどの果実にはプロテアーゼの存在が認められている。本試験では、日本とくに西日本ではイチジクが多く生産されているイチジク果実プロテアーゼを食肉の軟化に活用するために、食肉タンパク質におよぼすイチジク果実プロテアーゼの基本的性状を明らかにすることを目的にした。このために、牛肉タンパク質に対するイチジク果実プロテアーゼの凍結保存による活性の持続性について試験し、活性の塩濃度依存性、pH 依存性、温度依存性の影響について比較した。

材料および方法

牛肉試料

牛肉は冷凍のオーストラリア産牛腿肉を用いた。牛肉を卓上電動ミンサー(National, MK-G 3 S)で2度挽きし、真空包装した挽肉を -80°C で冷凍保存した。冷凍挽肉は実験前日に -4°C 冷蔵庫で半日かけて半解凍して実験に用いた。半解凍挽肉に4倍量の0.06% NaN_3 水溶液を加

え、ホモジナイザー(日音医理科, ヒスコトロン NS-50, 調節目盛り70, 1分間)で均質化し、ガーゼで濾過した後、攪拌しつつ吸引し、脱気したものを牛肉試料とした。

イチジク果実試料

イチジク果実は岡山県産西洋イチジクを用いた。果実の皮をむいた果肉に対して4倍量の蒸留水を加え、カッター(National Speed cutter MK-K70)を用いて均質化し、イチジク果実試料とした。イチジク果実試料は真空包装され、 -80°C で冷凍保存された。冷凍イチジク果実試料は実験前日に -4°C 冷蔵庫で半日かけて半解凍して用いた。

プロテアーゼ活性の測定

牛肉試料にイチジク果実試料を等量混合した。試料混合液は所定温度の恒温水槽(ヤマト科学, BL-31)中で反応させた。基本的に反応は 25°C で行った。所定時間後に反応液3mLに4% TCA を等量加え、反応を停止させた。室温で30分間置いた後、遠心分離(日立, himacCR 20E, 8,000 g, 4°C , 10分)した。

遊離ペプチド量はLowry法¹⁾により測定され、プロテアーゼ活性とした。すなわち、遠心上澄み0.2mLと蒸留水0.4mL, フェノール試薬0.4mL, Reg(2% Na_2CO_3 in 0.1N NaOH : 0.5% CuSO_4 : 1% $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7=50:1:1$) 3mL を混合した後、恒温水槽(ヤマト科学, BL-31)で 25°C , 30分間発色させ、分光光度計(島津, UV

-160)で波長650 nmの吸光度を測定した。果実プロテアーゼによる遊離ペプチド量は前記の反応溶液についての吸光度からブランクとして牛肉試料およびイチジク果実試料の各々について得られた吸光度を差し引いた吸光度(E650)をプロテアーゼ活性とした²⁾。

牛血清アルブミンを標準ペプチドとして上記のLowry法で測定し、遊離ペプチド量の指標とした。牛肉およびイチジク果実の各々に4倍量の蒸留水を加えて均質化し、これを等量混合した溶液から測定されたE650が1のとき、牛肉1 gからの遊離ペプチド量は牛血清アルブミン換算で83.3mgになった。

プロテアーゼ活性の冷凍保存の影響

冷凍(-80℃)保存されたイチジク果実試料について、冷凍0, 1, 3, 7ヶ月後に前記の方法でプロテアーゼ活性を測定した。

プロテアーゼ活性の塩濃度依存性

牛肉とイチジク果実試料の等量混合反応溶液中のNaCl濃度が、0, 2, 4, 8%になるように、あらかじめ牛肉試料にNaClを加えた。牛肉試料のpHは5.7であった。反応は25℃で行った。反応後、前記の方法でプロテアーゼ活性を測定した。

プロテアーゼ活性のpH依存性

牛肉試料のpHが4-9になるように、牛肉試料の10 mLに対して2%乳酸, 0.1N NaOHまたは0.2N NaOH, 蒸留水の計5 mLを加えた。これにイチジク果実試料を等量に加え、25℃で反応させた²⁾。牛肉試料のpHは5.7であった。反応後、前記の方法でプロテアーゼ活性を測定した。

プロテアーゼ活性の温度依存性

牛肉試料10 mLに0.2N NaOHを0.5 mL, 蒸留水4.5 mLを加えてpH 6.5に調整した。これにイチジク果実試料を等量に加え、5, 15, 25, 40, 60, 80, 90℃で反応させた。反応後、前記の方法でプロテアーゼ活性を測定した。

NEM阻害作用

牛肉試料3.3 mLにNEM(N-ethylmaleimide, ナカライ, Lot#: M1T7894)1.7 mL加えて、イチジク果実試料を5 mL加え、25℃または60℃で1時間反応させ、遊離ペプチド量を測定した。NEMは終濃度が0, 0.0136, 0.068, 0.34, 1.7 mMになるように牛肉試料に加えた。

タカジアスターゼとのプロテアーゼ活性の比較

タカジアスターゼ(三共株式会社)50 mgを蒸留水25 mLに溶解した。牛肉試料にタカジアスターゼ水溶液を等量混合して0, 0.5, 1, 2時間後に反応を停止させ、プロテアーゼ活性をイチジク果実プロテアーゼと比較した。

結果および考察

冷凍保存の影響

イチジク果実は常温あるいは冷蔵においても劣化が著

しい果実であるので、イチジク果実の利用にあたり、長期保存するために-80℃で凍結保存した。イチジク果実のプロテアーゼ活性におよぼす冷凍保存の影響をFig. 1に示す。プロテアーゼ活性は7ヶ月保存においても新鮮時と大差がなく、保持されていた。したがって、食肉軟化などへの利用やイチジク果実プロテアーゼの研究のために長期間保存が可能である。

塩濃度依存性

イチジク果実のプロテアーゼ活性におよぼす塩濃度の影響をFig. 2に示す。0-8%と高濃度ほど活性が高い傾向があるがほとんど差が認められなかった。一般に、食肉の調理や製造には食塩を2%前後加えるが、イチジク果実のプロテアーゼ活性は食塩濃度の依存性が低いので、塩漬肉を軟化させるのに有効であることが示唆され、利用上扱いやすいと考えられる。

pH依存性

植物プロテアーゼの最適pHはパパインで3-10, キウイフルーツで4.0, 洋梨で5.5と9.0, 生姜では5.0, メロンで10.5であることが知られている^{3,4)}。イチジクのプロテアーゼ活性のpH依存性は、Fig. 3に示すように、酸性域よりも中性域pH 6-7で活性が高くなったが、pH 4-7の範囲でほぼ一定であった。このように、広いpH範囲でプロテアーゼ活性に大差がみられないこと、また

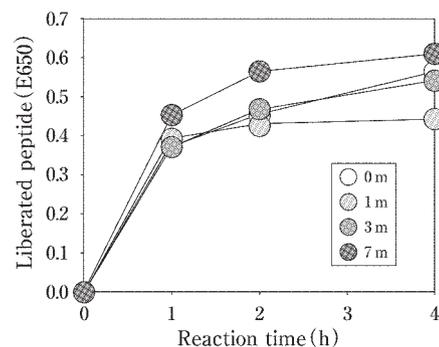


Fig. 1 Influence of freezing months on fig protease activity. Freezing temperature: -80℃

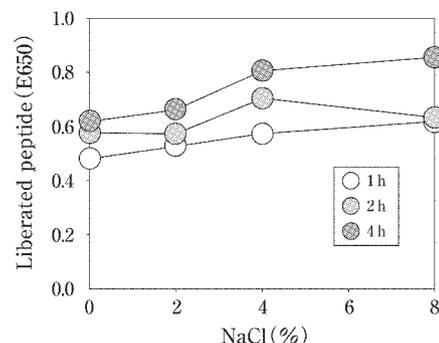


Fig. 2 Effect of salt concentration on fig protease activity. Reaction temperature: 25℃

pH 4-7の範囲は通常の食肉・食肉製品のpH範囲を十分にカバーしているので、食肉・食肉製品への利用においてプロテアーゼ活性だけに着目するときは特別なpH制御は必要ないと考えられる。

図に示すように、ブランクである牛肉試料のpHを高いアルカリ側に調整しても遊離ペプチドの増加はみられなかった。イチジク果実プロテアーゼによる遊離ペプチドは方法に示すようにブランクの牛肉試料およびイチジク果実試料の遊離ペプチドを差し引いた値である。アルカリ側に調整した牛肉試料にイチジク果実試料を加えると中性域にシフトし、図に示すように、たとえばpH 9.5付近はpH 7付近になった。経時的にpH低下の進行がとくに認められないので、イチジク果実試料を加えたことによるpHの低下はプロテアーゼ作用による酸性アミノ酸が優位に産生されたことではないことを意味する。また、イチジク果実には強い酸味は感じられないものの高い酸度で、強い緩衝能があることを示している。Fig. 4はpH調整した牛肉試料とこれにイチジク果実試料を加えた場合のpHの比較である。イチジク果実試料はpH 4.6付近であり、pH 5以下では変化が小さいが、アルカリ側ほど変化が大きい。pH調整しない牛肉試料とこれにイチジク果実試料を加えた場合はpH 5.3付近となる。食肉の保水性はpH 5付近で最低⁵⁾であるので、食肉の酸性化はドリップ損失が増えることになるので、食肉製品へのイチジク果実の利用は中性付近へpH調整した方がよいと考えられる。

食肉に乳酸を注入すると、pHが低下して筋肉内プロテアーゼのカテプシン活性が高くなり、軟らかくなる⁶⁾が酸性化によるドリップ損失と酸味の点で改善が必要であろう。

温度依存性

イチジク果実プロテアーゼ活性の温度依存性を Fig. 5

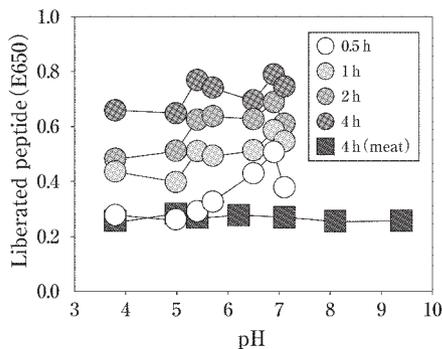


Fig. 3 Effect of pH on fig protease activity. Sample pH was adjusted with 2% Lactic acid, 0.1N or 0.2N NaOH and incubated for 4h. Liberated peptide increased slightly under higher pH. However, meat only as a blank, 4h (meat), did not depend on pH. reaction temperature: 25°C

に示す。イチジクのプロテアーゼ活性の温度依存性は60°C-90°Cの高温でも高い活性が認められ、5-25°Cの約2倍のペプチドを遊離した。最適温度は80-90°Cになった。

筋肉タンパク質の分解能が認められ、植物プロテアーゼの最適温度はパパインで70°C、キウイフルーツで40°C、洋梨で60°C、生姜で60°C、メロンで75°Cなどが知られている^{3,4)}。いずれも最適温度は高温であるが、イチジク果実プロテアーゼは最も高温であった。

NEMの阻害作用

イチジク果実プロテアーゼの最適温度は80-90°Cの高温であった。ブランクの牛肉試料のみでは高温でも遊離ペプチドの増加は認められなかったので、筋肉タンパク質やペプチドの加熱による分解は考えられなかった。80-90°Cの高温は一般的に酵素は失活する温度である。そこで、高温でも遊離ペプチドが酵素作用によるものか確かめるために、SH酵素の特異的阻害剤であるNEMの阻害作用を試験した。Fig. 6に示すように、反応温度25°C, 60°CのいずれもNEMによって遊離ペプチドの産生が阻害されたので、高温でもイチジク果実プロテアーゼが作用し、最適温度は極めて高いことが再確認された。高温での遊

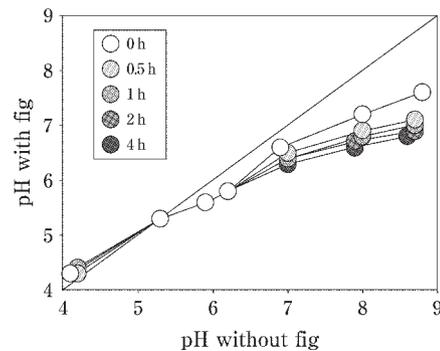


Fig. 4 Comparison between pH of pre- and post-mixing with fig for pH adjusted beef sample. Sample pH was adjusted with lactic acid or NaOH. The pH decreased remarkably after mixing with fig.

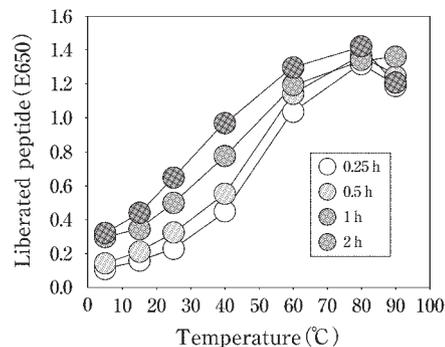


Fig. 5 Effect of temperature on fig protease activity. Sample pH was adjusted to 6.5 before reaction start.

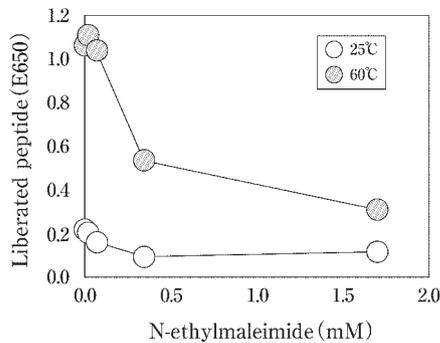


Fig. 6 Inhibitory effect of N-ethylmaleimide on fig protease activity.

Reaction time: 60 min

離ペプチドの増加は加熱食肉タンパク質の脆弱化の要因も考えられ、脆弱化をもたらすイチジク果実プロテアーゼによる被分解性の影響については興味もたれる。

タカジアスターゼとの活性の比較

イチジク果実プロテアーゼがどの程度の分解性であるか、市販の強力な消化薬であるタカジアスターゼと比較した。その結果、イチジク果実 1 g はタカジアスターゼ 10mg に相当する強い活性であることが認められ、食肉軟化剤としての可能性が高いと考えられた。

食肉軟化剤の視点からキウイフルーツ⁷⁾、メロン⁸⁾による食肉タンパク質分解性が電気泳動によって検討されている。キウイフルーツは酸味が強く、これのプロテアーゼであるアクチニジンはヨーグルトに加えると苦味ペプチドを産生する⁹⁾。また、パパインは強力なプロテアーゼであるが食肉から苦味を産生する¹⁰⁾。試験的に、イチジク果実処理した食肉には苦味が認められなかった。また、酸味も認められず、塩濃度依存性や pH 依存性が強くないので、食肉軟化処理の制御が容易であると考えられる。

要 約

イチジク果実プロテアーゼの食肉タンパク質におよぼ

す基本的性状を明らかにし、食肉軟化の可能性を検討した。食肉タンパク質からの遊離ペプチド量は反応 1 時間まで増加し、その後ほとんど一定に推移した。7 ヶ月間の -80°C 凍結保存でプロテアーゼ活性は保持された。活性は 0-8 %の塩濃度でほとんど差がなかった。pH 依存性において、酸性域よりも中性域 pH 6-7 で活性が高かったが、ほぼ一定であった。最適温度は高温度の $80-90^{\circ}\text{C}$ であった。この活性は N-ethylmaleimide で阻害された。イチジク果実 1 g はタカジアスターゼ 10mg のプロテアーゼに相当した。イチジク果実処理した食肉に苦味は認められなかった。

文 献

- 1) 菅原 潔・福島正美：蛋白質の定量法。pp. 98-109, 学会出版センター, 東京 (1986)
- 2) 熊谷圭三：イチジクのプロテアーゼ活性と牛肉の性状におよぼす影響。岡山大学農学部卒業論文, pp. 1-11 (1998)
- 3) 石下真人・鮫島邦彦：食肉軟化剤としての植物プロテアーゼ。New Food Industry, 36, 53-56 (1994)
- 4) 石下真人・鮫島邦彦：酵素処理による食肉の軟化。食肉の科学, 36, 5-10 (1995)
- 5) 泉本勝利：食肉の品質とその変化。動物資源利用学(伊藤敏敏ら編), pp. 198-208, 文永堂出版, 東京 (1999)
- 6) P. Berge, P. Ertbjerg, L. M. Larsen, T. Astruc, X. Vignon and A. J. Moller: Tenderization of beef by lactic acid injected at different times post mortem. Meat Sci., 57, 347-357 (2000)
- 7) 鮫島邦彦・崔 一信・石下真人・早川忠昭：アクチニジン(キウイフルーツタンパク質分解酵素)による筋肉構成タンパク質の分解。日本食品工業学会誌, 38, 817-821 (1991)
- 8) 石下真人・武田浩郁・H. D. Zakpaal・鮫島邦彦：メロンプロテアーゼの性質と筋肉タンパク質に対する作用。酪農学園大学紀要, 18, 5-12 (1993)
- 9) 西山一郎・大田忠親：キウイフルーツ果汁のアクチニジン濃度およびプロテアーゼ活性の品種間差。日本食品科学工学会誌, 49, 401-408 (2002)
- 10) B. Gerelt, Y. Ikeuchi and A. Suzuki: Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. Meat Sci., 56, 311-318 (2000)