酵素による硬質生肉の軟化と旨味生成について (その 1)

On the Formation of the Tasty Substance in and the Tenderization of Tough Meat by Proteolytic Enzymes (Part 1)

(昭和 37 年 7 月 15 日 受理)

別 所 秀 子 黒 沢 祝 子
(Hideko Bessho) (Shikuko Kurosawa)

In order to improve the tastiness and tenderness of raw beef in the cooking of tough round steak, the effects of various proteolytic enzymes on meat were investigated. In the formation of tastiness and tenderness, the protease of *Rhizopus* genus mold was found to be best by the organoleptic test, followed by *Bacillus subtilis alkaline* protease, Bromelain and Ficin in the decreasing order. Every proteolytic enzyme used there showed that it had its own specific amount of enzyme activity to give the best tastiness and tenderness to meat. In the cases of Bromelain and *Bacillus subtilis alkaline* protease, however, the taste of meat is noticeably affected by the amount of enzyme used, and even a slightly larger amount of enzyme than that needed for the formation of tastiness turns out rather to give a bad taste. On the other hand a great excess of the amount of *Rhizopus* mold protease did not change the tastiness produced there. Some analytical experiments on meat digests were undertaken to clarify such difference in the effect on meat according to the kind of proteolytic enzyme, and the implication of the results was discussed.

パパインなど、ある種蛋白質分解酵素は生肉の軟化ならびに旨味生成に有効であることはかなり古くから知られ¹⁾、また実際に応用されている。またその際に起こる肉の変化についても組織解剖学的研究がある程度なされている²⁾。著者らは硬質生牛肉も一般調理用に仕向ける方法を見出すことを目的として、種々蛋白分解酵素の硬質肉におよぼす影響を試験してきた。さきに、Papaya latex を応用した米国製 meat tenderizer とわが国で多量に生産されている枯草菌の中性 Protease³⁾ や *Rhizopus* 属糸状菌⁴⁾ の Protease とを比較したところ軟化力および旨味生成力は *Rhizopus* 属が Papain 酵素に劣らぬ優秀なものであることを知り、これについて報告した⁵⁾。

その後 *Rhizopus* 属糸状菌の生産する Protease が優秀であるのは、作用最適 pH が酸性側の Protease が一般に旨味生成に好都合なのか、それとも糸状菌 Protease の分解様式が Papain に近似しているためなのかどうかを確かめるため、作用最適 pH の異なる酵素すなわち著者らが従来供試して来た放線菌、枯草菌及び *Asper-*

gillus 属糸状菌ならびに植物 Protease や最近新たに入手した種々の酵素剤のうち硬質牛肉にたいして有効なものを、まず選別し、次いで供試酵素を牛肉の pH と同じ 5.8 でカゼインに作用させ、Folin 法⁶⁾ の変法で酵素力を比較し、それを尺度として生牛肉の軟化度、旨味生成の有無、その程度を官能試験すると共に肉の分解度を種々方法で検討した。これら結果について報告する。

実験方法および材料

1. 供試酵素剤の酵素活性度の比較

市販牛肉は個体差ならびに部位差があるため基質として Casein を用いた。Casein 溶液は牛肉の pH にあわせて 5.8 とし、それに酵素を 20°C で 10 分間作用させた後三塩化酢酸可溶性になった Folin 試薬呈色性アミノ酸、ペプチッドをチロシン相当量として測定した。〔第 1 表(その 1)(その 2) 参照〕。その条件でチロシン 10 γ を生ずる場合を酵素力 1 unit とし、酵素剤相互の活性度を比較した。その結果は第 2 表の通りであった。

第1表 (その1) カゼイン溶液の調製

カゼイン 1.2g

← { 1.2M 尿素液 30ml
0.3M 酢酸ソーダ液 30ml
0.3M 第二リン酸ソーダ液 30ml
← Conc. HCl (溶解に必要な最少量)

カゼイン溶液

← N HClあるいは N HaON にて pH を 5.8 に調節

pH 5.8 カゼイン溶液

← 蒸留水を加えて100mlとする

1.2%, pH 5.8 カゼイン溶液

(その2) 酵素力の測定

1.2%カゼイン溶液(pH5.8) 5 ml + 水0.5ml

← 予め20°Cに10分間以上インキュベート

← 酵素液0.5mlを添加

← 10分後0.4M TCA 5 mlを添加

20°Cに30分間放置後濾過

濾液 2 mlを分取

← { 0.4M Na₂CO₃ 5 ml
5 倍稀釈 Folin 試薬 1 ml

発色液

{ 37°C, 30分後1 cm層のキュベットを用い 660 mμ にて測定。加熱酵素を用い同様に操作して得た液をブランクとした。

第2表 供試酵素剤の酵素力
(酵素剤 1 mg当りのpH5.8における酵素力)

酵 素 剤 (起 源)	酵素力	備 考 作用最適 pH
Papain(精製) cysteine で活性化	units 20	5~7
Bromelain	24	3.7~3.9
Ficin	27	4~9
<i>Aspergillus saitoi</i> Protease	3	2.5~3.0
<i>Rhizopus niveus</i> Protease	9	3~4
<i>Rhizopus chinensis</i> Protease	3	4
<i>Streptomyces griseus</i> Protease. (Pronase)	17	7
<i>Bacillus subtilis alkaline</i> Protease (Nagarse)	6	10

供試生牛肉

通称(京都)カケおよびマクラといわれる部分はイチボ(aitchbone)のうら側で、すねに近い部分がいい、解剖学的⁷⁾には腓側広筋、内転筋、半膜様筋などからなり、外観、味ともに Round Steak⁸⁾や Roast として使われるが、しかし一般に硬肉で牛の種類によってはそれが甚だしい。実験には特にこの硬いカケ肉を用いた。

(京都三島亭より購入: 第1図参照)

第 1 図

実験結果

1. 酵素剤の種類とその使用最適量

前回と同様、生肉を筋繊維に直角に約1.5cm巾に切断し、後各切片の両端を切り落しながらだいたい四角で50g大の肉を用意し、それをホークでまんべんなくさした後それに食塩0.4g, 胡椒0.02g, 片栗粉5gおよび酵素からなる混合物をふりかけ、15°Cで30分間インキュベートしたのち、サラダオイルをしいたフライパンで一定条件下で焼いた。これについて Bradley⁹⁾の解析法を適用しながら、やわらかさ、おいしさを比較した。なお、パネルが比較的熟練してきたので、おいしさ(旨味)と適度のやわらかさの総合点を提出させた。第2図は12名の熟練パネルによって採点された平均値を示したものでその順位は試験した酵素の中 *Rhizopus* 属 Protease が最もよく *Bacillus subtilis alkaline* Protease, Bromelainはこれにつぎ、Pronase, Ficin はかなり劣った。

なお、それぞれの酵素剤についてその使用量との関係

第2図 各酵素剤による旨味生成の比較図

をみると、肉1g当りの酵素使用最適量は酵素活性で、*Rhizopus niveus* では40から80u, *Bacillus subtilis alkaline*では12uであるが24uは却って劣り Bromelainは10uが最高でこの場合も酵素使用量が増すとかえって悪結果になった。

2. 酵素処理肉の化学的検討

官能検査によって酵素の生牛肉に対する優劣をみることはなお問題があると思われるが、少なくとも著者らの試験した酵素剤の中では *Rhizopus* 属糸状菌の Protease が前報と同様おいしかったが、枯草菌のアルカリ Protease がこれに次いで好まれる旨味を与えたことは注目すべきことである。枯草菌中性 Protease は良結果を与えなかった。植物酵素では Bromelain が良かったが、枯草菌アルカリ Protease よりは劣った。そこでこれら三者についてそれぞれ生牛肉、腓側広筋、内転筋に作用させ、その場合の蛋白分解の様相を検査することにした。すなわち第 3 表にしたがい測定した。

第 3 表 水溶性総 N, アミノ N, アンモニア N および TCA 可溶総 N の測定法

ホモジナイズした生牛肉 20g

←水 30ml

ペースト

←酵素添加 (15°C)
60 分後沸騰湯中にて 10 分間加熱

加熱酵素反応液

←水を添加 200ml 容とし、濾紙 (東洋 No. 2) 濾過

濾液

{ 総 N キルダール法
アミノ N Joseph 法¹⁰⁾
アンモニア N pH 8.4 (硼酸, 硼砂緩衝液) にて直接蒸溜

一部に等量の 1.2M TCA, 37°C 30 分後濾過

TCA 可溶液

総 N キルダール法

酵素処理によって生成あるいは増加した水溶性の総窒素, アミノ窒素, アンモニア窒素および TCA 可溶性の総窒素を測定した。なお, 酵素は前記味覚試験での最適値ならびにその倍量を使用した。その結果は第 4 表の通りで, 旨味の生成は蛋白の水溶性化, あるいは TCA 可溶性化, アミノ基の増加などとは直接比例しない。どちらかといえば適度の分解の際に旨味は生成されるといい得るにすぎない。すなわち *Rhizopus niveus* はある程度多くの酵素量が必要であるが枯草菌アルカリ Protease, Bromelain いずれの場合も少ない酵素量を用いた時に旨味が生成されている。そして *Rhizopus niveus* では水溶性 N が 6 mg のときも 7.9 mg のときも旨味の優劣は殆んどないが, 枯草菌アルカリ Protease は 13 mg N では旨味は少なくなるが 9.8 mg 位ではかなりの旨味を呈したからである。

これらのことから, Protease が適度に反応してある種 Peptide が生成された際に旨味が生じ, 酵素反応がそれ

以上進行すると, その旨味 Peptide が分解され旨味が少なくなるものと考えられる。もちろんそれらの進行過程ならびに生成旨味 Peptide の種類は Protease の種類すなわち特異性によって異なると思われる。

第 4 表 酵素を作用させた場合の生肉の変化

消化に使った酵素とその量	生肉 1g より生じた			
	水 溶 性			TCA 可溶性
	総 N (mg)	NH ₂ -N (mg)	NH ₃ -N (mg)	総 N (mg)
無処理 (対照)	4.32	0.61	—	3.78
<i>Rhizopus niveus</i> protease 40u/g meat	6.07	3.03	0.459	5.40
<i>Rhizopus niveus</i> protease 80u/g meat	7.97	4.50	0.675	6.61
<i>Bac. subtilis alkaline</i> protease 12u/g meat	9.72	4.00	0.405	8.10
同 上 24u/g meat	13.51	5.39	0.675	10.94
Bromelain 10u/g meat	9.72	0.99	0.054	7.02
同 上 20u/g meat	10.67	1.11	0.432	8.78

なお酵素処理はそのように旨味を生ずるのみならず, 表などより明らかな如く, 総蛋白 N の約 1/5 にも達する TCA 可溶 N を生じさせるなどのことから, 消化吸収上極めて有意義なことと思われる。

総括ならびに考察

硬質生牛肉カケ (内転筋, 腓側広筋) を軟化して一般調理用にしむける方法を見出すことを目的として, 種々蛋白分解酵素剤の硬質肉に及ぼす影響を試験した。

①官能試験の結果, 一般に軟化度, 旨味の点で *Rhizopus* 属 (*niveus*) 糸状菌の Protease (40~80u/g meat) が最も優れ, *Bacillus subtilis alkaline* Protease (12u/g meat), Bromelain (10u/g meat) がこれに次ぎ Ficin (28u/g meat) は最も劣っていた。

②旨味生成に適当な酵素の量 (酵素活性度にて比較) は酵素の種類によって異なった。すなわち旨味生成には *Bacillus subtilis alkaline* は比較的少量で足りるが, *Rhizopus* 属糸状菌の場合はかなりの量を必要とした。Bromelain など植物酵素の最適値は前者と同様であった。

③ *Rhizopus* 属糸状菌 Protease の場合は酵素の使用量が相当過剰でも旨味が減退することはないが枯草菌アルカリ Protease の場合は使用量が過剰になると著しく旨味が減退した。Bromelain などの場合も枯草菌に似た傾向があった。

④肉の軟化はだいたいにおいて, いずれの酵素の場合も酵素の使用量と並行した。しかし旨味生成と肉の軟化

との間には直接の並行関係はみられなかった。

⑥旨味生成と蛋白の水溶性化あるいは TCA 可溶化, アミノ基の増加などとの間には直接比例性はみられずどちらかといえば, 適度の分解の際に旨味が生成されるとみなされるにすぎなかった。

⑥旨味が最高に達した場合の酵素による肉の分解度は水溶性化したNとして *Rhizopus* 属糸状菌 Protease では約15%, 枯草菌アルカリ Protease では22%であった

終りに, 牛肉の組織解剖学的な御教示を給わった京大教授上坂章次博士, 貴重な酵素剤を御恵与いただいた大阪市大の山本武彦博士, 長瀬産業の屋代光良氏および新日本化学工業の市川和宏氏に謹んで深謝いたします。また, 実験に協力を惜まれなかった藤井敬子, 後藤明子, 後藤恵津子, 原田睦の諸姉に対して心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Gottschall, G. Y., et al. : *Food Research*. 7, 373 ~ 381 (1942). H. Wang, et al. : *Food Research* 19, 534 ~ 556 (1954)
- 2) H. Wang & Nehema Maynard : Division of Histology, American Meat Institute Foundation, Univ. of Chicago
- 3) 福本, 山本, 市川; 日本農芸化学誌 32, 230 ~ 235 (1958)
" " 32, 375 ~ 379 (1958)
- 4) 山本, 福本, 市川, 鷹見; 日本農芸化学大会要旨集(於東京) (1959)
- 5) 日本栄養・食糧学会総会(於大阪)にて発表(1960)
- 6) 萩原文二; 酵素研究法(赤堀四郎編) 第2巻 p. 242 (1956)
- 7) 上坂章次: 和牛全書 (1952)
松井潔: 家畜比較解剖学 (1948)
- 8) 小林文子: 調理科学講座 4 応用調理学(下田吉人編) 8 (1962)
田中徳三郎: 西洋料理事典 p. 305 (1962)
- 9) Bradley, Ferry : *Biometrika.*, 39, 324 (1952)
" " 41, 502 (1954)
- 10) Joseph R. Lpnes : *Methods in Enzymology*, Vol. 2, p. 468 ~ 471

(同志社女子大学)

食餌中のビタミンAおよび銅量と豚肝臓中のそれらの集積の関係,
ならびにそれに対するガンマ線照射の影響

豚のビタミンAならびに銅の摂取量と, 肝中のビタミンA, 銅量の関係を, 28 頭の2才豚ならびに40頭の幼豚を用いて検討し, さらにその一部について, 2才豚1頭あたり350r(レントゲン)の γ 線をCo-60源より全照射して, その影響をみた。

1. ビタミンAの補給は, 肝中の銅量を減少。
2. 銅の補給は, 肝中ビタミンA量を増大。

3. γ 線照射は, 肝中の銅量を増大した。

Gamma Irradiation and Interrelation of Dietary vitamin A and Copper on Their Deposition in the Liver of Swine.

by R. L. Shirley, T. N. Meacham et al.,
J. Nutrition. 78, p. 454 (1962) (久保)