放線菌酵素の利用に関する研究 (第9報)*

イカ肉の酵素的分解

杉本 洋, 岩浅 孝, 石井茂孝, 横塚 保 (野田醤油株式会社中央研究所)

昭和 39 年 7 月 29 日 受理

緒 言

著者らは先に放線菌 No. 41 株の生産する酵素系を用いて酵母菌体を酵素的に分解し, アミノ酸類及び 5'-IMP を含む 5'-ヌクレオチド類を呈味の主体として強い旨味を有する分解液を得, これが簡単な精製処理を施すことによって食品用調味基材として好適なものであることを示した^(1,2). またその際, 本株の生産する酵素系には強力なプロテアーゼ活性⁽³⁾の他に, 5'-AMP デアミナーゼ (DAase) 活性が存在することを指摘し, その生産条件等についても報告した⁽⁴⁾.

一方, 斎藤らは水産動物筋肉中の ATP 関連物質の検討を行い, 軟体動物, 特にイカ肉中のヌクレオチド類は AMP, ADP, ATP 等のアデニンヌクレオチド類に限られ, 通常の魚肉中に広く見出される 5'-IMP は検出されず^(5,6), これはイカ肉中では通常の魚肉中と異なっており, DAase が欠損していることが原因であるとしている⁽⁷⁾. その後, 同様な事実は清水⁽⁸⁾及び中島ら⁽⁹⁾によっても確認されている.

著者らは No. 41 株の生産する酵素系を用いてイカ肉を酵素的に加水分解させた場合, 蛋白質がプロテアーゼによって分解され多量のアミノ酸を生ずると同時に, 肉中に存在する 5'-AMP は DAase によって酵素的に脱アミノ作用を受け 5'-IMP に転換し酵母分解液同様, アミノ酸及び 5'-ヌクレオチドの双方を呈味の主体とする分解液が得られようとの予想の下に検討を行い, ほぼ満足すべき結果を得, さらに本株の生産する DAase の性質に関しても二, 三の新知見を得たのでこれらの結果をも合せて報告する.

材料及び方法

I. 酵素液の調製

放線菌 No. 41 菌の胞子を 500 ml 振盪フラスコ中 50 ml の YP 培地 (第1表) に斜面培養 (Bennet 培地) から 1 白金耳宛接種し, これを往復振盪培養機 (毎分 160 往復, 振幅 7 cm) にセットして 30° で 24 時間の培養を行い, これを種菌とする. この種菌を 20 l ワールドホッフ型ジャー・ファーメンター (関東理化学製作所製 KR-W 型) 中, 所定の殺菌を行った 10 l の YP 培地に 500 ml 宛接種し, これに消泡剤として 10 ml の醤油油及び 2 ml の Antifoam A (Dow Corning 社製) を添加し通気量 10 l/min, 攪拌数 600 r. p. m. を以て 30° で 48 時間の培養を行い, 培養液を 3,000 G で 15 分の遠心分離を行って菌体を除去し上澄を以て YP 酵素液とした.

第1表 YP 培地組成

乾燥酵母 (日本甜菜糖株式会社製, ニッテンドライイースト)	1.0%
可溶性澱粉	2.0%
KH ₂ PO ₄	0.5%
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.05%
C. S. L. (コーンステープリカー)	0.5%
pH	7.2

II. 酵素活性の測定方法

プロテアーゼ, DAase, スクレアーゼ, 5'-ヌクレオチダーゼ (NDase) 及びホスホモノエステラーゼ (PMase) 等の測定方法及び表示方法はおおむね既報⁽⁴⁾に従って行った.

III. 基質の調製

市販冷凍スルメイカを室温にて解凍し内臓部分を除去した後, そのまま 15 lb で 10 分の熱処理を行い, これをプレート孔径 3 mm の肉挽器 (チョッパー) を使用して細碎し基質とした.

* Studies on Utilization of Enzymes Produced by *Actinomycetes*. Part IX. Enzymatic Decomposition of Squid Meat.

By Hiroshi SUGIMOTO, Takashi IWASA, Shigetaka ISHII and Tamotsu YOKOTSUKA (Central Research Institute of Noda Shōyu & Co., Ltd.)

IV. 分析方法

1) 一般分析: 全窒素 (TN), ホルモール態窒素 (FN), アンモニア態窒素 ($\text{NH}_3\text{-N}$) 及び L-グルタミン酸等の分析方法及び表示方法はすべて既報⁽¹⁾に従って行った。

2) ヌクレオチド類: Bergkvist ら⁽¹⁰⁾のイオン交換クロマトグラフィーを改変した既報⁽²⁾の方法を用いて分別を行い, 量的算出にあたっては Volkin ら⁽¹¹⁾の紫外吸光係数, 及び著者ら⁽²⁾によって実験的に算出された紫外吸光係数の双方を使用した。

結果及び考察

I. 基質成分について

基質であるイカ肉中の窒素成分に関する一般分析値を第 2 表に, ヌクレオチド類組成を第 2 図 (A) 及び第 6 表にそれぞれ示す。第 2 表 原料イカ肉 (外套膜) の一般分析値

水分	77.5%
TN	3.36%
水溶性 TN	1.04%
FN	0.22%
$\text{NH}_3\text{-N}$	0.023%
GA	2.84 mg/g
水溶性 GA	0.85 mg/g

なお, 試料採取方法は窒素成分に関しては蒸煮後チョッパーで細碎した試料について, ヌクレオチド類組成に関しては冷凍状態のままチョッパーで細碎した生試料について中島ら⁽⁹⁾の方法に従って過塩素酸 (PCA) でヌクレオチド類を抽出して行った。

著者らの得た結果ではイカ肉中のヌクレオチド類の量及び質は, 斎藤ら⁽⁵⁾及び中島ら⁽⁹⁾の報告した結果とはかなり相違していて ATP は検出されず, ADP の量もまた著しく少なく, AMP の量も彼らの報告の結果よりはやや少ない。

これは斎藤ら^(12,13)及び清水⁽⁸⁾の認めるごとくイカ肉中のヌクレオチドは魚肉中のそれとは趣きを異にして共存するホスファターゼ及びアデノシンデアミナーゼの強い活性のためにかなり不安定で, たとえ冷凍状況下に保存していても比較的短時日のうちに消失するという事実に起因するものと思われる。

この点, 漁獲高も多く廃棄率は逆に少なく, またいわゆる APF (Animal Protein Factor) を含む原料として資源的にも栄養学的にも有利なイカ肉ではあるが, このようにヌクレオチドの利用をも目的とした呈味液製造原料として考えた場合には漁獲後, AMP 含量が最大になるような時期に適当な熱処理を加えてこれらの酵素反応を停止させるような措置が必要であって, この点, 冷

凍下の状態では IMP が比較的安定である魚肉, たとえばコイ肉⁽¹⁴⁾, タラ肉⁽¹⁵⁾ 等に比較してやや面倒であると言える。

II. 酵素液成分及び諸酵素活性について

酵素液中の窒素成分に関する一般分析値を第 3 表に示す。いずれも分解液成分に影響を与えるほどの量ではないが, 分解液の TN 溶解利用率の算出にあたっては一応この酵素液に由来する TN は除外して行った。

なお, 酵素液中のヌクレオチド類は既報⁽¹⁾で見られたごとく無視小である。

また, 酵素液中の諸酵素の活性についての測定結果を第 4 表に示す。特に DAase 活性は既報^(1,2)の経験からして基質中の AMP を脱アミノするのに十分量であり PMase 活性は無視小, NDase 活性も低くインキュベーション温度で急速に失活し, ヌクレオチド類の脱リン酸のおそれはほとんど無いと思われる⁽²⁾。

第 3 表 YP 酵素液の一般分析値

TN	0.035%
FN	0.014%
$\text{NH}_3\text{-N}$	0.007%
GA	0.08 mg/ml

第 4 表 YP 酵素液中の諸酵素活性

プロテアーゼ	2.540
5'-AMPデアミナーゼ	0.228
ヌクレアーゼ	1.135
5'-ヌクレオチダーゼ	0.131
ホスホモノエステラーゼ	0.012
pH	7.88

III. 酵素的分解操作について

分解操作を一括して第 1 図に示す。ほぼ酵母菌体分

第 1 図 酵素分解操作

解^(1,2) の場合になら行っているが、インキュベーションの pH は 8.0 ではなく 7.5 を採った。これは後述するように DAase の最適 pH が中性付近にあることが判明したので、より最適条件へ近づける目的とインキュベーション中の褐変現象をいくらかでも軽減する意味とから行ったものである。

IV. 分解液成分について

分解液の窒素成分に関する一般分析値を第 5 表に示す。酵母菌体を基質にした場合に比較して TN 溶解利用率は若干劣るもののようである。

ヌクレオチド類の分析結果は第 2 図 (B) 及び第 6 表に示した。すなわち少なくとも現象的にはイカ肉中の 5'-AMP はほぼ定量的に 5'-IMP に変化して分解液中に回収されている。この場合、5'-AMP の残存が若干観察され、さらに ADP の減少を伴っているところから

第 5 表 分解液の一般分析値

TN	1.550% (TN 溶解率=80.2%)
FN	0.451% (FN/TN=29.1%)
NH ₃ -N	0.072%
GA	1.41 mg/ml
固型分	11.6%

第 6 表 原料イカ肉及び分解液中のモノヌクレオチド類の収支

	AMP	IMP	ADP	ATP	計
原料イカ肉 1g	4.54 μ M (100%)	—	0.53	—	5.07 (100%)
分解液 1.74ml (原料 1g 相当)	0.37 (8.25%)	4.25 (93.7%)	0.43	—	5.05 (99.6%)

ADP の一部は脱リン酸され 5'-AMP ないし 5'-IMP にまで変化したものと推定される。

また、本株 No. 41 のヌクレアーゼはいわゆる 5'-ホ

スホジエステラーゼの一種に相当し RNA より 5'-リボヌクレオチドを生成するのでイカ肉中の RNA の影響も皆無ではないが、量的には無視小であると考えられる。

分解液は赤橙色、清澄であって“乾するめ”のような香気と濃厚な旨味を呈するがわずかに苦味を呈する。この苦味の原因は秦ら⁽¹⁶⁾ がフィッシュ・ソリュブルについて検討しているようにペプチドにあるものと考えられる。ただし、イカ肉中の脂肪含量は一般の魚肉類に比較して非常に少ないのでこれら脂肪の分解、酸敗等に伴う悪臭はほとんどなく、この点食品加工上有利である。

分解液はさらに適当条件下に、たとえば Duolite S-30 のような吸着樹脂で処理することにより、アミノ酸、ヌクレオチド類の吸着をほとんど伴うことなく極めて効果的に色素、苦味の大部分を除去することが可能であって、そのままあるいは他の食品の調味基材として香味とも全く問題のない製品とすることができた。

第 2 図 原料イカ肉及び分解液中のモノヌクレオチド類のカラムクロマトグラフィー
(カラム: Dowex 1×4, ギ酸型 (100~200 メッシュ) 0.9 cmφ×20 cmL)

V. 5'-AMP デアミナーゼ (DAase) の二, 三の性質について

前記酵素液をそのまま DAase 粗標品として既報⁽⁴⁾の活性測定方法に基づき二, 三の性質を検討した。

1) 最適 pH : DAase 活性と反応時 pH との関係を図 3 に示す。すなわち最適 pH は中性付近にあり, pH 4.0 では活性発現はほぼ完全に抑制される。

2) 最適温度 : DAase 活性と反応時の温度との関係を第 4 図に示す。反応は 5 分間という短時間で測定を行っているが, この限りにおいては最適温度は 55° 付近にある。

3) pH 安定性 : DAase の pH 安定性及び測定条件を図 5 に示す。すなわちかなり広範囲の pH にわたってこの酵素は安定であり, 特に pH 7.0~9.0 の中性~微アルカリ性にかけてほとんど失活することがない。

4) 温度安定性 : DAase の温度安定性及び測定条件を図 6 に示す。すなわち 40° までは安定であるが, 60° 以上の温度で急速に失活する。イカ肉の酵素的分解に際しインキュベーション温度を 50° に採っているが, この温度は必ずしも DAase が完全に安定である温度とは言えない。

要 約

(1) 放線菌 No. 41 株の生産する酵素系を用いてイカ肉の酵素的分解を試みた結果, 蛋白質が加水分解され多量のアミノ酸を生ずるとともに, イカ肉中の 5'-AMP はほぼ定量的に 5'-IMP に変換した。

(2) 分解液は強い旨味を呈し, かんたんな後処理を加えることにより食品用調味基材として好適なものとなった。

(3) 5'-AMP デアミナーゼの二, 三の酵素的性質について検討を加えた。

本稿を終了するに当り御指導を賜った東大坂口謹一郎名誉教授, 有馬 啓教授, 池田庸之助教授, 野田産研専務理事茂木正利博士, 有益な御助言を頂いた本所吉田広務氏, 杉山晋一博士, 分析の一部を担当された竹内啓幸, 杉下 操両氏, 最後に本報告の発表を許可された本社取締役各位に深甚なる謝意を表するしだいである。

第 3 図 DAase 活性と反応 pH
(下記緩衝液 0.05 M 濃度中で反応)

第 4 図 DAase 活性と反応温度

第 5 図 DAase の pH 安定性
(下記緩衝液 0.015 M 濃度中に 16 時間放置後 pH 7.5 で測定)

第 6 図 DAase の温度安定性

0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.5)
中各温度に 10 分間放置後急冷

- (1) 杉本 洋, 岩浅 孝, 石山二郎, 横塚 保 : 本誌, 37, 677 (1963).
- (2) 杉本 洋, 岩浅 孝, 横塚 保 : 本誌, 38, 441 (1964).
- (3) 岩浅 孝, 杉本 洋, 茂田井宏, 横塚 保 : 本誌, 38, 90 (1964).
- (4) 杉本 洋, 岩浅 孝, 横塚 保 : 本誌, 38, 144 (1964).
- (5) 斎藤恒行, 新井健一 : 北大水産彙報, 7, 243 (1956).
- (6) 斎藤恒行 : 日水誌, 27, 461 (1961).
- (7) 斎藤恒行, 新井健一, 田中ツネ : 北大水産彙報, 9, 121 (1958).
- (8) 清水 亘 : 研究報告集録(農学篇), 188(1961).
- (9) 中島宣郎, 市川恒平, 鎌田政喜, 藤田栄一郎 : 本誌, 35, 803 (1961).

- (10) R. Bergkvist, A. Deutch : *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1877 (1954).
 - (11) E. Volkin, W. E. Cohn : "Methods of Biochemical Analysis", **1**, 287 (1954).
 - (12) T. Saito, K. Arai, T. Tanaka : *Nature*, **181**, 1127 (1958).
 - (13) 斎藤恒行 : 研究報告集録(農学篇), 184(1961).
 - (14) T. Saito, K. Arai : *Nature*, **179**, 820(1957).
 - (15) N. R. Jones, J. Murray : *Biochem. J.*, **80**, 26 (1961).
 - (16) 秦 満天, 秦 正弘, 杉本昌明 : 日水大会講演, 東京 (1963).
-