トランスグルタミナーゼ処理による食肉素材の接着機構

添田孝彦[§], 外園亜紀子, 小澤貴彦, 藤原 尚

九州共立大学工学部環境化学科

Characteristics and Mechanism of Binding of Foods by Microbial Transglutaminase

Takahiko Soeda[§], Akiko Hokazono, Takahiko Ozawa and Hisashi Fujiwara

Department of Environmental Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu Kyoritsu University,
1-8 Jiyugaoka, Yahatanishi-Ku, Kitakyushu 807-8585

On the production of restructured meat using microbial transglutaminase (MTG), there was the report that meat cubes showed acceptable binding in combination with MTG and caseinate. The acceptability of food proteins except of caseinate was studied for binding sausage pieces by MTG, and the mechanism of binding was investigated. By optimizing the volume of water added for food proteins, not only caseinate but also gelatin and soy protein showed effective binding by MTG. The amount of ϵ -(γ -glutamyl)lysine linkage in binding surface of sausage was contributed to binding strength. The amount of the crosslinkage in bound sausage pieces was just 33~75 μ mol, on the other hand, 320~846 μ mol in glue paste. Tight binding was obtained by binding the adhesive surfaces of sausage. Based on the examination by microscope, it was suggested that glue paste permeated into a narrow space of binding surface of sausage, and gelled by MTG afterwards.
(Received Aug. 9, 2004 ; Accepted Feb. 16, 2005)

食品用酵素である微生物起源トランスグルタミナーゼ¹⁾²⁾ (E.C. 2.3.2.13, 以下 MTG と略す) は蛋白質中の Gln 残基と Lys 残基間の架橋結合形成を触媒する酵素である。本酵素の食品への利用として、魚肉すり身ゲルの弾力強化³⁾、鶏肉ゲルの食感改善⁴⁾、麺の歯ごたえの増強や茹で延び防止⁵⁾ および豆腐の弾性付与⁶⁾ などの例がある。

MTG の活発な応用分野として接着機能⁷⁾ があり、食品の接着ではこれまでアルカリ剤⁸⁾ や食塩を用いる方法しかなかったが、安全性や味の点で不適格であった。Kuraishi ら⁷⁾ は MTG 単独では接着能はみられないが、カゼイネート併用により接着が可能であること、カゼイネート以外の食品蛋白質では接着はできないことを示した。

著者らは MTG による接着においてカゼイネート以外のゼラチンおよび大豆蛋白質でも可能であることを明らかにし、その接着のメカニズムを考察したので報告する。

実 験 方 法

1. MTG

天野エンザイム社製の放線菌由来 MTG を用いた。本酵素の比活性は 1.0 ユニット/mg であった。

2. 食品蛋白質

カゼイネートは変性度の低い噴霧乾燥品「ミプロダン」(MDI 社製, 蛋白 90%) および変性度の高いエクストルーダ品「サンラクト」(太陽化学社製, 蛋白質 90%) を用いた。ゼラチンはニッピゼラチン社より 2 種類を入手、高粘性ゼラチンは JIS 法による粘度が 40 cps, ゼリー強度 219 g, 低粘性ゼラチンは粘度 25 cps, ゼリー強度 108 g であった。大豆蛋白質は味の素社製「アジプロン」, すなわち, HS 2 (低粘性高ゲル化), SU (高粘性高ゲル化) および酵素分解品 HO (低粘性ゲル化能なし) を用いた。

3. 接着材料

生肉を使用する場合接着性にバラツキが生じたため、品質的に一定である市販ソーセージ (ポロニアタイプ) を用いた。数種のソーセージについての接着では同一商品であれば接着力は近似した結果を得たので、常に一定のメーカーのソーセージを試料として用いた。このものは直径約 5 cm, 長さ約 20 cm, 重量約 370 g であった。

4. 接着テスト用試料片の調製

図 1 のように試料を輪切りし (図 1 A), 2 枚の試料の一面に MTG, 蛋白質, 水からなる糊剤を塗る (図 1 B)。糊剤は蛋白質 10 g に対し所定量加水後 MTG 1 ユニット/g, protein を加えた。図 1 C の状態で冷蔵庫内で一晩放置による酵素反応後, 端部を切って方形とし (図 1 D), 縦 5

〒807-8585 福岡県北九州市八幡西区自由ヶ丘 1-8

[§] 連絡先 (Corresponding author), tsoe@kyukyo-u.ac.jp

図 1 接着テスト用試料片の調製

図 2 各種食品蛋白質の接着における影響
MTG 添加量, 1 ユニット/g, protein.

mm, 横 10 mm に切断して測定用試料 (図 1 E) とした.

5. ϵ -(γ -glutamyl)lysine 結合量

ϵ -(γ -glutamyl)lysine (以下, ϵ -(γ -Glu)Lys と略す) 結合量を接着試料中の糊剤と接着界面部の 2 ケ所で測定した. 糊剤はそのまま凍結乾燥し, 接着界面部は試料を接着面から剥がし, 接着面を流水で 15 分間指で擦るように糊剤を洗い流した接着表面から剃刀でこさぎとった断片を凍結乾燥した. 乾燥後ヘキサミンにて脱脂した試料を Kumazawa ら⁹⁾の方法で測定した. この方法の概略を示すと, 試料を凍結乾燥後, プロナーゼ, ロイシンアミノペプチダーゼ, プロリダーゼおよびカルボキシペプチダーゼの 4 種の酵素で加水分解後, 架橋結合画分混液とし, HPLC により分取し, OPA 溶液添加後 HPLC により分析をおこなった. 結合量表示は蛋白質 100 g あたりの μmol とし, 本文中では単に μmol とした.

6. 接着テスト

Kuraishi ら⁷⁾の方法に従って接着強度を求めた. 図 1

(E) 試料の両端に直接金具をさし込んでレオメータに固定, 上部固定部を上昇させて接着面が切り離されるに要する荷重を求め接着強度 (g) とした.

7. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

既報¹⁰⁾に従って接着断面の観察をおこなった.

実 験 結 果

1. 各種食品蛋白質の接着強度におよぼす影響

糊剤蛋白質への加水量の接着におよぼす影響を図 2 に示した. カゼイネートではエクストルーダ品サンラクトが噴霧乾燥品ミプロダゲンよりも高い接着強度を有し, 最高接着強度を示す加水量はサンラクトで 10 倍, ミプロダゲンは 4 倍であった. ミプロダゲンの接着力が劣る理由は, 変性を受けてないミプロダゲンは低粘性を有し, 高加水系ではその液性が非常に粘性のないものとなるためであると考えられた.

ゼラチンの場合, 粘性と接着性の関係を見るため高粘度ゼラチンと低粘度ゼラチンを用いた. 高粘性ゼラチンは加

水量 20 倍まで接着強度は増大、一方、低粘性ゼラチンでは加水量が 10 倍で高い接着強度を示し、それ以上の加水では直線的に低下した。ゼラチンの場合もカゼイネートの場合と同様加水に伴う蛋白質濃度の変化に伴うゲル化に起因すると考えられた。そこで、最適加水量を選択する必要がある。

大豆蛋白質の場合、HS2 は加水量 4～10 倍で接着強度は高く 300 g を維持し、SU はすべての加水域で低い接着力しか示さず、手で軽く引っ張っただけで剥がれた。この理由は、高粘性で高ゲル化性をもつ SU の場合には HS2 と比べて、MTG の自由な拡散、基質への接近が妨げられて、SU は HS2 と比べて低い接着力を示すと考えられた。このことは、低粘性で反応性の高い HS2 は高粘性で反応性の低い SU より高い接着性を示しことを示している。HO の場合は、加水量が 2～6 倍の低い加水量で 300 g の接着強度を示したが、加水量が 8 倍を超えると急激にその接着強度の低下を示した。ゲル形性能をもたない HO でも MTG との組み合わせと適正な加水量を決定することによって接着が可能となった。加水が増加すると MTG によるゲル形性能が弱くなるため接着強度は低下したと考えられた。

以上より、加水量を蛋白質の粘性に合わせて選択することによってカゼイネート以外の蛋白質でも接着が可能であることが確認された。この接着において加水量に伴う蛋白質濃度と MTG との反応性が重要であり、MTG によるゲル化がすばやく起こり過ぎると、接着界面で糊が十分なじむ前に一部の蛋白質がゲル化してしまい、蛋白質のすべてが接着に寄与できなくなる。よって、接着にはゲル化の速度を制御する最適の加水量を選定することが重要であった。

2. ϵ -(γ -Glu)Lys 結合量と接着性

接着のメカニズムを調べるために、接着界面における ϵ -(γ -Glu)Lys 結合量を測定した。測定用試料として、ソーセージ側の接着界面部と MTG と蛋白質からなる糊部を用いた。まず、ソーセージ中の結合量を求め表 1 に示した。

この表には坂本ら¹¹⁾ のハム類中の結合量の平均値を参考までに併記した。表 1 からソーセージ中では 17.8 μ mol の結合量を示し、坂本らの分析結果の範囲の下限にあった。

ついで、接着試料中 2 ケ所の結合量を表 2 に示した。糊部の結合量は 320～846 μ mol と幅を示した。カゼイネートは約 800 μ mol、大豆蛋白質は約 650 μ mol、ゼラチンは 320～518 μ mol を示した。一方、接着界面部での結合量は全体で 33～75 μ mol しか示さなかった。個別にみると、カゼイネート 59～65 μ mol と大豆蛋白質 56～75 μ mol はほぼ近似した結合量を示し、ゼラチンの場合は 33～40 μ mol と低かった。この接着界面部においてゼラチンでの結合量が低い理由としては前述したようにゼラチンは温度依存性が高いため、糊を塗ると同時に糊部の品温が冷えて、MTG が反応する前に糊部のゼラチンの一部がゲル化してしまい、接着界面との架橋反応が物理的に起こりにくくなるためであると考えられた。また、糊部と接着界面の結合量の対比から、カゼイネートが大豆蛋白質よりも接着界面での結合量が低かった理由はカゼイネートが大豆蛋白質よりも MTG との反応性が高いと考えられ、ゼラチンの場合と同様カゼイネートの一部がゲル化したためと考えられた。

接着強度と結合量の関係を図 3 に示した。この図より糊部の結合量との間では相関はみられなかったが、接着界面部の結合量との間での相関は高く、接着表界面での結合量が多いほど高い接着強度を示した。このことから、接着には糊部とソーセージを結びつける接着界面での架橋結合量に関与していることが示唆された。

表 1 ソーセージ中の ϵ -(γ -Glu)Lys 結合量

試料	ϵ -(γ -Glu)Lys 結合量 (μ mol / 100g, protein)
試料ボロニアソーセージ	17.8
cf	
坂本らによるハム類の	39.4 $\pm$ 21.5
G-L 含量	(17.9～60.9)

表 2 糊材としての蛋白質種類、接着強度および ϵ -(γ -Glu)Lys 結合量の関係

蛋白質種類		加水量 (倍)	接着強度 (g)	糊部の ϵ -(γ -Glu)Lys 結合量 (μ mol/100 g, protein)	接着表面部の ϵ -(γ -Glu)Lys 結合量 (μ mol/100 g ,protein)
カゼイネート	ミプロダグ	10	320	846	59
	サンラクト	10	420	777	65
ゼラチン	低ブルームゼラチン	10	330	486	40
	同上	20	180	518	
	高ブルームゼラチン	10	120	400	33
	同上	20	352	320	
大豆蛋白質	アジプロン HS2	10	330	667	75
	アジプロン SU	10	80	648	56
	アジプロン HO	10	200	654	

MTG 添加量, 1 ユニット/g, protein.

図 3 接着界面部と糊部中の $\epsilon-(\gamma-\text{Glu}) \text{ Lys}$ 結合量と接着強度の関係

図 4 接着面の走査型電子顕微鏡による観察 (倍率 $\times 100$)

- (A), 完全に接着し糊部が観察される断面;
(B), 接着はしているが糊部が観察されない断面.

表 1 でソーセージ中の架橋結合量は $17.8 \mu\text{mol}$ であった。一方、接着界面部での結合量は $33 \sim 75 \mu\text{mol}$ であり、MTG によって試料と糊部の接着面で新たに形成された架橋結合はカゼイネートで $41 \sim 47 \mu\text{mol}$ 、ゼラチンで $15 \sim 22 \mu\text{mol}$ 、大豆蛋白質で $38 \sim 57 \mu\text{mol}$ であるといえる。すなわち、糊部の全結合量に対してカゼイネートは 5%、ゼラチン 4%、大豆蛋白質 7%、平均的にみると約 5% の架橋結合が新たに糊部と接着界面で形成されたことが示唆された。

3. 接着面の組織観察

カゼイネート「サンラクト」の 10 倍加水における接着試料の接着界面を走査型電子顕微鏡で観察した結果を図 4 に示した。この写真から接着面の糊部は非常に狭い間隙をなし、かつ、入り組んだ状態にあった。図 4 では大部分を占める完全に接着し糊部がはっきりと観察できる断面 (A) および一部の糊部が接着面にいきわたっていないが全体としては接着されている断面 (B) を示しているが、A と B いずれも接着面間の間隔は $32 \sim 134 \mu\text{m}$ を示し、平均的な

間隔は $50 \sim 100 \mu\text{m}$ であるといえた。

本稿では接着モデル試料としてソーセージを採用したが、ソーセージ以外の生肉どうしの接着やハム、ベーコンなどの食品に対しても本結果は適用することができた。

考 察

適切な加水量を選定することによってカゼイネート以外のゼラチンや大豆蛋白質においても同等の接着が可能であることが見出された。この接着には加水量に伴う蛋白質濃度と MTG と蛋白質間の反応性が関係し、加水による適度の粘性と反応性をもった場合接着界面組織への浸透を可能とし、接着も期待できた。接着界面での架橋結合量について、糊部中の結合量は $320 \sim 846 \mu\text{mol}$ 、試料側の接着界面部では $33 \sim 75 \mu\text{mol}$ であり、試料側接着界面部の結合量は糊部中の $1/10$ 程度でしかなかった。しかしながら、この接着界面部の結合量と接着強度の相関が高かったことから、このわずかな結合によって試料接着界面と糊部は剥がれな

いように固定されると考えられた。さらに、接着面の組織観察から、糊部の蛋白質が試料の接着界面の間に複雑に入り込んでゲル化していることが観察された。このような組織状態をつくるには糊剤の粘性が強く関与し、適度の粘性ではじめて接着面の間に浸透できると推察された。

以上より、MTGの接着メカニズムは、①適度の粘性をもつ糊部が試料の隙間に浸透、②蛋白質糊がMTGにより接着界面との間で架橋結合を新たに起こすと同時に、③糊部のゲル化により接着界面と糊部が固定されることによる接着現象であると推察された。MTGが接着に寄与する条件は、糊剤の加水による適度な粘性保持、MTGによるゲル化促進であり、その結果接着面と糊部との間で架橋結合が新たに形成されることが重要である。蛋白質自体のゲル化能は重要ではなく、MTGによりゲル化能が付与されることが必要と考えられた。

要 約

MTGの接着における糊剤として、カゼイネートに限らずゼラチンや大豆蛋白質も有効であった。糊剤に対する加水量はカゼイネート8～10倍、ゼラチン10倍（低ブルーム品）～20倍（高ブルーム品）、大豆蛋白質4～6倍が最適であった。糊部および接着界面部の架橋結合量を測定した結果、接着強度は接着界面部の架橋量と相関を示し、糊部の架橋量とは相関しなかった。接着界面部の架橋量は糊部の4～7%にすぎなかった。このわずかな結合量でも糊部と接着界面部を繋ぎ合わせることができ、強い接着性が得られると考えられた。電顕による組織観察から接着のメカニズムを考察すると、糊部が接着表面の間に浸透し、それとともにMTGにより架橋結合が生成し、固定が完了すると考えられた。

本研究の走査型電子顕微鏡観察にご支援いただいた九州共立大学工学部生地文也教授に深謝する。

文 献

- 1) Ando, H., Umeda, M., Matsuura, Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka H. and Motoki, M., Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2613-2617 (1989).
 - 2) 本木正雄, 添田孝彦, 安藤裕康, 松浦 明, トランスグルタミナーゼの有用性研究とその実用化, 農化, **69**, 1301-1308 (1995).
 - 3) 添田孝彦, 渡井口清一郎, 沼沢俊哉, 坂口正二, 久原智穂, スケトウダラすり身ゲル物性におよぼすトランスグルタミナーゼの影響, 食科工, **43**, 780-786 (1996).
 - 4) Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., Sathe, S.K. and Soeda, T., Soybean and milk protein modified by transglutaminase improves chickensausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Science*, **63**, 191-197 (2003).
 - 5) 山崎勝利, 鳴戸 康, 丹野裕之, 添田孝彦, 麵物性に及ぼす微生物起源トランスグルタミナーゼの影響, 食科工, **51**, 13-17 (2004).
 - 6) 添田孝彦, 石井智穂, 山崎勝利, 村瀬和良, 豆腐物性に及ぼすトランスグルタミナーゼの影響, 食科工, **42**, 254-261 (1995).
 - 7) Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C. and Soeda, T., Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salts or cooking. *J. Food Sci.*, **62**, 488-490 (1997).
 - 8) Means, W.J. and Schmidt, G.R., Algin/calcium gel as a raw and cooked binder in structured beef steaks. *J. Food Sci.*, **51**, 60-65 (1986).
 - 9) Kumazawa, Y., Seguro, K., Takamura, M. and Motoki, M., Formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link in cured horse mackerel induced by drying. *J. Food Sci.*, **58**, 1086-1089 (1993).
 - 10) 添田孝彦, 分離大豆タンパク質冷蔵ゲルの物性および組織観察, 食科工, **42**, 485-491 (1995).
 - 11) Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Kawajiri, H. and Motoki, M., ϵ -(γ -glutamyl)lysine crosslink distribution in foods as determined by improved method. *J. Food Sci.*, **60**, 416-419 (1995).
- (平成16年8月9日受付, 平成17年2月16日受理)