コハク酸モノグリセリドの牛肉軟化効果

森 建太*・河合 滋*・沖坂浩一*・佐々木博隆*
横山高明*・西邑隆徳**・安川拓次*

Effect of Succinylated Glycerol Monostearate on
Tenderness of Roasted Beef

Kenta MORI*, Sigeru KAWAI*, Kouichi OKISAKA*, Hirotaka SASAKI*,
Takaaki YOKOYAMA*, Takanori NISHIMURA** and Takuji YASUKAWA*

* Food Products Research Labs., Kao Corporation, 20, Higashi Fukushima,
Kamisu-machi, Kashima-gun, Ibaraki 314-0103

** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido
University, Sapporo, Hokkaido 060-0809

We examined effects of various surfactants on physical and sensory properties of roasted beef. Succinylated glycerol monostearate (SGMS), a safety anionic surfactant, was the most effective tenderizer among various surfactants tested. When both sides of sliced beef were coated with 2% (w/w) SGMS powder, then roasted at 200°C, about 11% of the total amount of SGMS penetrated into the beef. SGMS did not affect the shrinkage rate of myofibrils, but reduced that of the epimysium, and reduced the shear-force value of the intramuscular connective tissue. After heating the SGMS-coated epimysium for 30 min at 65°C, collagen fibrils were decorated with granular and sheet-like materials. The latter may be a complex of SGMS and heat-denatured collagen. These results indicate that SGMS tenderizes beef through inhibiting the heat-shrinkage of the intramuscular connective tissue. We conclude, therefore, that SGMS is a novel and effective meat tenderizer.

(Received Jan. 14, 1998 ; Accepted Apr. 14, 1998)

牛肉の品質を決める要因の中で軟らかさは最も重要である。牛肉の硬さは筋原線維の死後の存在形態と筋肉内結合組織の量と質によって左右されることが知られており¹⁾²⁾、筋肉内結合組織を構成するコラーゲンは加熱することによってゼラチン化するので、牛肉を長時間煮ると軟らかくなる³⁾。また、牛肉の軟化には、植物由来のチオールプロテアーゼであるパパインをを用いる方法が一般的である。屠畜前の牛にパパインを注射することにより筋肉内結合組織を消化して、通常の熟成による以上に牛肉を軟らかくする手法も試みられている⁴⁾。しかし、パパインは温度や時間の影響を受けやすく、牛肉が過度に軟化⁵⁾することも知られている。最近、これらの性質を

改善したタンパク質分解酵素を用いて牛肉を軟化する試みがなされている⁶⁾⁷⁾が、完全ではない。

タンパク質と界面活性剤との相互作用については、溶解した球状タンパク質に関する報告⁸⁾があるが、コラーゲンやエラスチンのような線維状タンパク質に関する研究は少ない。陰イオン性界面活性剤がコラーゲンやエラスチンなどの線維状タンパク質に結合すると、生化学的および物理的性質が変化することが報告されており⁹⁾¹⁰⁾、界面活性剤が筋肉内結合組織（筋内膜および筋周膜）を構成するコラーゲンに結合すると、牛肉を軟化させる可能性が予測された。本研究で使用した陰イオン性界面活性剤であるコハク酸モノグリセリド (SGMS) は 1966 年

* 花王株式会社食品研究所 (〒314-0103 茨城県鹿嶋郡神栖町東深芝 20)

** 北海道大学農学部畜産科学科 (〒060-0809 札幌市北区北 9 条西 9 丁目)

に HREUND¹¹⁾ によって作出されて日本およびアメリカ合衆国において食品添加物として認可され、パンを作る際の有効な生地調整剤 (dough conditioner) として利用されており、安全性には問題が無い。本研究では、食肉の軟化に及ぼす SGMS の効果を明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. 試料

牛肉試料は 32 ヶ月齢の黒毛和種去勢牛から半腱様筋を採取し、市場で販売されている牛肉を想定しているので 10 日間 4℃ で熟成した後、試料として使用した。各種界面活性剤は精製を行わず市販品をそのまま用いた。供試した各種界面活性剤を Table 1 に示す。

2. ローストした牛肉の剪断力価の測定

筋線維方向に対して垂直に厚さ 5 mm にスライスし、3×5 cm の牛肉の両面に隙間なく均一に塗布することによって、重量比で 2% となるように粉末状の各種界面活性剤を塗布し、200℃ に熱した鉄板上で表を 1 分 30 秒、裏を 1 分間ローストした。これらから 2×4 cm の試料を切り出し、Warner-Bratzler Shear Model 3000 (G-R Electric Mfg. 社製) を用いて剪断力価を測定し、5 回の測定値を平均した。

3. ローストした牛肉の官能検査

各種界面活性剤を塗布してローストした牛肉サンプルを官能評価に優れた被験者 5 名により、硬い, 1; やや硬い, 3; 普通, 5; やや軟らかい, 7; 軟らかい, 9 として評

価した。

4. 牛肉中の SGMS の定量

SGMS を塗布してローストした牛肉試料 10 mg をメタノールとベンゼンを 2:8 に混合した溶液 1 ml で抽出し、メチルエステル化剤 (トリメチルシリルジアゾメタン/ヘキサン, 東京化成) を 0.5 ml 加えて、室温で 30 分間放置した。次に溶媒を除去した後、トリメチルシリルエタノール化剤 (シリル化剤 TH, 関東化学) を 0.5 ml 加えて室温で 45 分間放置し、蒸留水 1 ml を加えて反応を停止させた後、ヘキサン 1 ml を加え、よく攪拌した。静置してヘキサン層を分離し、ガスクロマトグラフィーで分析した。ペンタデカン酸を指標にして検量線を作成して、ローストした牛肉中の SGMS 量を定量した。

5. 筋原線維の調製

筋原線維の調製は、TATSUMI らの方法¹²⁾ に準じて次のように行った。牛半腱様筋を採取してできるだけ結合組織を取り除き細切した後、筋肉の 7.5 倍量の 0.1 M KCl, 2 mM EGTA, 1 mM ジチオトレイトール, 10 mM Tris-maleate (pH 6.8), 2 mM ピロリン酸ナトリウムを加え、ブレードタイプのホモジナイザー (ヒスコロン超高速ホモジナイザー NS-60, 日音医科機器製作所) を用いて、10 000 rpm で 60 秒間ホモジナイズし、1 000×g で 10 分間遠心分離して沈殿を得た。沈殿物に 7.5 倍量の 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM ジチオトレイトール, 10 mM Tris-maleate (pH 6.8) を加えて攪拌のため 10 000 rpm で 1 秒間ホモジナイズした後 1 000×g で 10 分間遠心分離し、この操作を 5 回繰り返して牛半腱様筋

Table 1

Abbreviation	Trade name	Main constitution	Manufacture
LC	Lecitin	Phospholipid from soybean	a
GMS	T-95	Glycerol α -monostearate	b
HGR	CR-500	Hexaglycerol-condensated ricinolate	a
HGTS	TS-500	Hexaglycerol tristearate	a
TGPS	PS-310	Tetraglycerol-pentastearate	a
SS-0	S-070	Sucrose stearic acid esters HLB: 0	c
SS-11	S-1170	Sucrose stearic acid esters HLB: 11	c
SS-15	S-1570	Sucrose stearic acid esters HLB: 15	c
CGMS	621 B	Citrylated glycerol monostearate	d
LGMS	661 AS	Lactylated glycerol monostearate	d
DATGMS	641 C	Diacetyl tartarated glycerol monostearate	d
SGMS	S-SS	Succinylated glycerol monostearate	b

a, Sakamoto Yakuhin Co., Osaka; b, Kao Co., Tokyo; c, Mitsubishi-kagaku Foods Co., Tokyo; d, Taiyo Chemical Co., Mie.

の筋原線維を得た。

6. 筋原線維の加熱収縮率の測定

10 mg/ml 程度に希釈した筋原線維懸濁液を位相差顕微鏡 (BH-2 型, オリンパス社製) により観察し, サルコメアの長さを測定した。筋原線維懸濁液を試験管に入れて, 恒温槽で 65°C, 30 分間加熱した対照区と, SGMS を重量比で 2% 添加して同様に加熱した処理区とを比較した。

7. 筋上膜の加熱収縮率の測定

半腱様筋の最外層を覆っている厚さ約 2 mm の筋上膜を採取し, 5×20 mm に整形して使用した。筋上膜と 0.1 MKCl, 10 mM Tris-maleate (pH 6.8) を試験管に入れ, 恒温槽により 1 分間に 1°C の割合で温度を上昇させた。各温度における筋上膜の長さを測って加熱収縮率とし, 重量比で 2% の SGMS を加えた処理区と無添加の対照区について, それぞれ 5 回ずつ長さを測定して比較した。

8. 筋上膜の剪断力値の測定

筋上膜を 0.1 MKCl, 10 mM Tris-maleate (pH 6.8) とともに試験管に入れ, 恒温槽中で 80°C で 30 分間加熱した。この試料を室温にし, レオメーター (NRM-2002 J, 不動工業) を用いて線維方向に対し垂直な剪断応力を測定し, 剪断応力の最大値を剪断力値とした。

9. モデル筋肉内結合組織の剪断力値の測定

モデル筋肉内結合組織は NISHIMURA らの方法¹³⁾ を一部改変して作製した。すなわち骨格筋から切り出した組織片 (10×10×20 mm) を 10% NaOH 溶液に室温で 18 時間浸漬し筋線維のタンパク質を可溶化した。黄褐色になった組織片を蒸留水に移し, 筋線維成分が除去されて白色透明の結合組織のみとなるまで室温に放置した。この間, 蒸留水を 1 日 2-3 回交換した。得られた結合組織標品を加熱処理した後に 10% ポリアクリルアミドゲル溶液に浸漬して重合させ, 筋周膜および筋内膜からなるモデル筋肉内結合組織とした。モデル筋肉内結合組織を試験管に入れ, 6 ml の 0.1 MKCl, 10 mM Tris-maleate (pH 6.8) を加えた後, 恒温槽中で 80°C で 30 分間加熱した。この試料を室温にし, レオメーター (NRM-2002 J, 不動工業) を用いて線維方向に対し垂直な剪断応力を測定し, 剪断応力の最大値を剪断力値とした。

10. 走査電子顕微鏡観察

筋上膜に SGMS を重量比で 2% 添加して 65°C で 30 分間加熱した試料と, SGMS を添加せずに 65°C で 30 分間加熱した試料および SGMS を添加せず加熱しない試料を 1% の四酸化オスミウムに 1 時間漬けて固定した

後, 1% のタンニン酸に 1 時間浸漬して後固定し, エタノール系列で脱水した。その後, エタノールを *t*-ブチルアルコールで置換し, 試料に白金パラジウムを蒸着した後, 走査電子顕微鏡 (S-800, 日立製作所) で観察した。

実験結果および考察

1. ローストした牛肉に及ぼす界面活性剤の影響

各種界面活性剤を牛肉に塗布してからローストし, 剪断力値の測定と官能評価を行い, 得られた結果を Fig. 1 と Fig. 2 に示した。供試した各種界面活性剤は, その効果に程度の差はあるもののいずれも対照区に比較して軟化効果を示した。これらの界面活性剤による牛肉の軟化の特徴は, 界面活性剤を塗布した直後にローストしても効果を発揮することであり, タンパク質分解酵素を用いたときのように一定の反応時間を必要としない。また, 過剰反応による食感や風味の悪化は全く起こらず, 使用しやすい軟化剤であることが明らかになった。これらの各種界面活性剤の中で SGMS 処理区の剪断力値は

Fig. 1 Effects of various surfactants on tenderness of beef

Beef samples were treated with various surfactants (2%, w/w), then roasted at 200°C. The shear-force value was measured for each sample. Vertical bars represent standard errors for five replicates in each case. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. See also Table 1 for abbreviations.

Fig. 2 Effects of various surfactants on the sensory evaluation of tenderness

Beef samples were roasted after coating with various surfactants and evaluated for tenderness by five trained sensory panelists. Vertical bars represent standard errors for five replicates in each case. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. See also Table 1 for abbreviations.

対照区の 3.61 kg に対して 1.52 kg と最も低い値を示し (Fig. 1), 官能評価値では 8 を越え, SGMS には著しい軟化効果のあることが確認された。界面活性剤の中でも SGMS, DATGMS, LC などの陰イオン性界面活性剤は, 他の非イオン性界面活性剤と比べると軟化効果が大いことから, 牛肉中のタンパク質と界面活性剤との相互作用の強さの違いがローストした牛肉の軟化の程度之差になったと考えられる。各種の界面活性剤は, 種々のタンパク質と相互作用することが知られており⁸⁾, その中でも特に陰イオン性界面活性剤とタンパク質の間には強い相互作用があると報告されている⁹⁾。従って, SGMS, DATGMS, LC などの陰イオン性界面活性剤は, 牛肉中のタンパク質と強い相互作用をすることにより軟化効果を発現すると考えられる。

2. ローストした牛肉に対する SGMS の浸透性

SGMS を塗布してローストした後に, 牛肉内部への浸透性を調べると, 重量比で 2% の SGMS を塗布した場合全量の約 11% が牛肉内部に浸透していることが明らかになった。SGMS はローストした牛肉に浸透して軟化

効果を発現することから, 筋原線維のタンパク質および筋肉内結合組織のタンパク質 (コラーゲン) のいずれかに作用していると予測された。牛肉は加熱すると収縮して硬くなる¹⁴⁾ ことから, 牛肉を構成する筋原線維および筋肉内結合組織の加熱収縮に対する SGMS の影響を検討した。

3. 筋原線維に対する SGMS の影響

単離して加熱した筋原線維のサルコメアの長さの変化を Fig. 3 に示した。25℃ におけるサルコメア長は平均 $2.85 \pm 0.21 \mu\text{m}$ であり, SGMS を加えた場合も加えない場合も差異はなかった。65℃ に加熱することによりサルコメア長が短くなり, 対照区の筋原線維では, 平均 $1.98 \pm 0.10 \mu\text{m}$ になった。SGMS 溶液中で加熱した場合もサルコメア長は平均 $1.99 \pm 0.09 \mu\text{m}$ であり, 筋原線維の加熱収縮には対照区との間に有意な差が認められなかった。SGMS は筋原線維の加熱収縮に対しては影響を及ぼさないことが明らかになった。

4. 筋肉内結合組織に対する SGMS の影響

食肉の軟らかさに直接関与している筋周膜および筋内膜は単離して加熱収縮性を検討することが困難なので, 筋肉内結合組織として筋上膜を用いた。Fig. 4 に示すように筋上膜は 57.5℃ 以上で急激に収縮した。SGMS で

Fig. 3 Effects of SGMS on shrinkage of myofibrils

Myofibrils (10 mg/ml) were heated at 65℃ for 30 min. Vertical bars represent the standard errors for five replicates in each case.

Fig. 4 Effects of SGMS on shrinkage of bovine epimysium

Beef epimysium were heated at various temperatures for 30 min. Control (○) and SGMS-treated samples (●). The degrees of shrinkage differed significantly above 60°C ($p < 0.01$).

処理することにより 60°C 以上では筋上膜の加熱収縮が有意 ($p < 0.01$) に抑制された。SGMS により筋上膜の加熱収縮が抑制されることによって、対照区と較べて牛肉が軟らかくなると予測された。Fig. 5 A に示した通り、加熱した筋上膜の剪断力値は対照区では 2.75 kg/cm² であったのに対し、SGMS 処理を行うと 2.22 kg/cm² へ低下しており筋上膜が軟らかくなることが示された。さらに、筋原線維を主体とする筋線維のタンパク質を除去して調製した筋周膜および筋内膜のみからなるモデル筋肉内結合組織の剪断力値も対照区の 0.155 kg/cm² に対して、SGMS で処理した場合には 0.118 kg/cm² と顕著に低下した (Fig. 5 B)。これらの結果から SGMS は加熱した筋肉内結合組織に強く作用して軟化効果を発現することが明らかになった。

筋上膜に対する SGMS の影響を走査電子顕微鏡によって観察した (Fig. 6 A~D)。未加熱の筋上膜のコラーゲン線維は直径約 0.1 μm のコラーゲン細線維が多数集合した構造 (Fig. 6 A) として観察された。SGMS 処理して加熱していない筋上膜コラーゲンは、未処理未加熱のコラーゲンとの違いが認められなかった (Fig. 6 B)。SGMS は常温では粉末状で約 55°C で融解する。常

Fig. 5 Effects of SGMS on tenderness of bovine intramuscular connective tissue

Epimysium samples coated with 2% SGMS were heated at 65°C for 30 min, then the shear force value was measured (A). Samples of the intramuscular connective tissue model were heated at 65°C for 30 min with 2% SGMS, then shear force value was measured (B). Vertical bars represent standard errors for five replicates in each case.

温で水に分散してもほとんど溶けていないと考えられ、コラーゲンとの間で反応が起こらなかったことが推測された。それに対し、65°C で 30 分間の加熱によりコラーゲン細線維上に球状構造物が現れた (Fig. 6 C)。SGMS 処理をした後に加熱した場合には、コラーゲン細線維上に球状構造物の他に板状構造物が観察され (Fig. 6 D)、後者はコラーゲンと SGMS の複合体であろうと推測された。

本研究で得られた結果から、SGMS は筋原線維のタンパク質ではなく、筋肉内結合組織 (筋周膜および筋内膜) のコラーゲンに結合して加熱収縮を抑制し、牛肉の軟化効果を発現することが示唆された。また、SGMS はタンパク質分解酵素とは異なり、牛肉をローストすることにより直ちに軟化効果を発現するとともに、食味や風味に全く影響を与えない優れた食肉軟化剤であることが判明した。

要 約

食肉添加物として認められている界面活性剤を塗布し

Fig. 6 Scanning electron micrographs of the epimysium of bovine *semitendinosus* muscle

A, Intact epimysium. Collagen fibrils were about $0.1\mu\text{m}$ in diameter. B, SGMS-coated epimysium at room temperature. C, The epimysium after heating at 65°C for 30 min. Collagen fibrils were decorated by fine granular materials shown by arrows. D, SGMS-coated epimysium after heating at 65°C for 30 min. Collagen fibrils were decorated with granular (arrows) and sheer-like materials (arrow heads). Scale bar indicates $3\mu\text{m}$.

た牛肉をローストすることにより以下の結果が得られた。

(1) 各種界面活性剤はローストした牛肉を軟化した。特に SGMS は強い軟化作用を有することが分かった。

(2) ローストした牛肉では塗布量の約 11% の SGMS が浸透しており、牛肉を構成する成分に作用していることが明らかになった。

(3) SGMS は筋原線維の加熱収縮には影響を及ぼさないことが、加熱した筋原線維のサルコメアの長さの変化から示された。

(4) SGMS は筋上膜の加熱収縮を有意に抑制し、SGMS で処理した筋上膜およびモデル筋肉内結合組織を加熱すると、対照区と比べて顕著に軟化することが示された。また、走査電顕によって加熱した筋上膜を観察した結果、SGMS で処理することによってコラーゲンと SGMS の複合体と見なされる板状構造物が認められた。従って、SGMS は筋肉内結合組織のコラーゲンに作用して加熱収縮を抑制することにより牛肉の軟化効果を発現すると推定された。

本研究を遂行するに当たりご指導を頂きました北海道大学農学部畜産科学科の高橋興成教授に深く感謝します。

文 献

- 1) BAILEY, A.J. : *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 995 (1972).
- 2) BAILEY, A.J. and SIMS, T.J. : *J. Sci. Food Agric.*, **28**, 565 (1977).
- 3) RESURRECCION, A.V.A. : *Muscle Foods*, KINSMAN, D.M., KOTULA, A.W. and BREIDENSTEIN, B.C. (Ed.), (Chapman and Hall Inc. New York), p. 407 (1994).
- 4) BAILEY, A.J. and LIGHT, N.D. : *Connective tissue in meat and meat products*, (Elsevier Science Publishers, Ltd., London), p. 195 (1989).
- 5) CRONLUND, A.L. and WOYCHIK, J.H. : *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 502 (1986).
- 6) BERNAL, V.M. and STANLEY, D.W. : *J. Food Sci.*, **51**, 834 (1986).
- 7) WILSON, S.A., YOUNG, O.A., COOLBEAR, T. and DANIEL, R.M. : *Meat Sci.*, **32**, 93 (1992).
- 8) STEINHARDT, J. and REYNOLDS, J.A. : *Multiple Equilibria in Proteins*, HORECKER, B., KAPLAN, N., MARMUR, J. and SCHERAGA, H. (Ed.), (Academic Press Inc. New York), p. 234 (1969).
- 9) MALDONADO, F., ALMELA, F., OTERO, A. and COSTA-LOPEZ, J. : *J. Protein Chem.*, **10**, 189 (1991).
- 10) KAWAZOYE, S., TIAN, S.F., TODA, S., TAKASHIMA, T., SUNAGA, T., FUJITANI, N., HIGASHINO, H. and MATSUMURA, S. : *J. Biochem.*, **117**, 1254 (1995).
- 11) E.H. HREUND, U.S.P., 3293272 (1966).
- 12) TATSUMI, R., HATTORI, A. and TAKAHASHI, K. : *J. Biochem.*, **113**, 797 (1993).
- 13) NISHIMURA, T., OJIMA, K., LIU, A., HATTORI, A. and TAKAHASHI, K. : *Tissue & Cell*, **28**, 527 (1996).
- 14) DAVEY, C.L. and GILBERT, K.V. : *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 931 (1974).

(平成 10 年 1 月 14 日受付, 平成 10 年 4 月 14 日受理)