酸性条件における牛腱膜コラーゲンの溶解に及ぼす 粗アクチニジンと加熱の併用効果

和田正汎[§], 山口静子, 惟村直仁*, 長谷川忠男

東京農業大学応用生物科学部

* 織田栄養専門学校

The Liquefaction Effects of Crude-Actinidin Treatments with Heating on Adult Cattle Aponeuroses Collagen under acidic conditions

Masahiro Wada[§], Shizuko Yamaguti, Naohito Koremura*, and Tadao Hasegawa

Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture,

1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-Ku, Tokyo, 156-8502

*Oda Nutrition College, 5-35-8, Nakano, Nakano-ku, Tokyo 164-0001

About 1% of cattle aponeuroses was extracted after 60 min of heating in hot water at 85°C. The collagen subunit chains containing β - and α -chains were not detected in the insoluble fractions of cattle aponeuroses after 60 min heating at 80°C by SDS-PAGE analysis. The insoluble fractions were treated with plant thiol proteases such as crude-actinidin, papain, bromelain and ficin at 70°C for 60 min under acid conditions, and then the effects of extraction from the treated-cattle aponeuroses were analyzed by measuring the yield of total and extracted-collagen. The percentage of extraction from the cattle aponeuroses treated with crude-actinidin, papain, bromelain or ficin was at a level of 34.7, 11.7, 6.6, and 2.8% yield, respectively ($p < 0.01$). Furthermore, collagen subunit chains were detected in the heated-aponeuroses (85°C, 60 min) treated with crude-actinidin at 37°C for 3 h in 0.5 M acetic acid, but not detected in the un-heated aponeuroses extracted with 0.5 M acetic acid at 37°C for 3 h.

(Received Dec. 13, 2002 ; Accepted Aug. 8, 2003)

結合組織は、骨に付着し筋肉を間接的に固定している。この種のものに筋膜、腱、腱膜があり、これらを一般にすじと呼ぶ。牛の腱膜は、硬くスープ材料として利用される以外、長時間調理による加熱をおこなっても咀嚼できる軟らかさが得られにくいので、調理において食材として使用されることはほとんどない。結合組織の主成分はコラーゲンである。コラーゲンを加熱すると80°Cでゼラチン化する¹⁾²⁾。牛半腱様筋の筋肉内結合組織を加熱すると、50°Cから温度の上昇とともに溶解が進み、70°Cで最大になる。しかし、80°Cから溶解は大幅に低下することが報告されている¹⁾。Ando *et al.*³⁾は、イカ外套膜が沸騰水に30分間浸しても、45~70%のコラーゲンは沸騰水に溶解しないことを示した。タンパク質分解酵素の中には加熱による溶解の代替をおこなうものがある。トリプシンは、ゼラチンを容易に加水分解する。また、変性したコラーゲンに対しても同

程度の分解能を示した⁴⁾。パパイン、ブロメライン、フィシンは植物性チオール系酵素のファミリーで、肉の軟化に利用されている。しかし、未変性の結合組織を分解することはできない⁵⁾。アクチニダインはキウイフルーツに含まれるタンパク質分解酵素で、植物性チオール系酵素に属している。アクチニダインはゼラチンをよく分解することが知られている⁶⁾。大山ら⁷⁾は、pH 3, 6又は9の緩衝液中でゼラチンを27°C、1時間粗アクチニダインにより反応処理をおこなうと、ゼラチンの α および β 成分は完全に消失することを報告した。

しかし、牛の腱膜を加熱又は酵素により溶解した報告は、これまで見当たらない。腱膜のなかで第1頸椎~第5胸椎部位は長時間加熱しても変形しないことから保型性が良いという点では食品材料として適していると思われた。そこで、85°Cの熱水に浸した牛腱膜に0.1 M 酢酸と粗アクチニダインを加え反応処理したものを調理したところ腱膜は咀嚼できる軟らかさになった。腱膜が軟らかくなったのは結合組織の主成分であるコラーゲンが溶解したためと思われるので、溶解と深い関わりのある加熱処理と粗アクチ

〒156-8502 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1-1

* 〒164-0001 東京都中野区中野 5-32-8

[§] 連絡先 (Corresponding author),

kaihatsu@npc-nagaoka.co.jp (長岡香料東京研究所)

ニダインによる腱膜の溶解効果について検討をおこなった。

実験方法と材料

1. 牛腱膜

と畜3～6日後の3頭の6才齢ホルスタイン種雌牛の腱膜を市場から購入した。腱膜を切り裂き、第1頸椎～第5胸椎部位（以下、腱膜と称す）の腱膜を得た。腱膜の大半は、そのまま凍結し、使用に先立ち1晩冷蔵庫で解凍後、官能評価試料として用いた。残りは、付着脂肪と筋肉を除き細切後、清浄化のため0.05 M トリス-HCl 緩衝液（pH 6.8）と蒸留水で3回繰り返し、清浄化のために洗浄した。この操作は全て4℃でおこない、洗浄した試料は13000×gで20分間遠心分離し、沈殿を溶解性の測定試料として用いた。

2. 酵素

キウイ果実（ニュージーランド産、Hayword 種）は、市販品を購入し、破碎後、13000×gで20分間遠心分離をおこなった。上清を粗アクチニダインとして使用した⁷⁾⁸⁾。粗アクチニダインの活性は、大山らの方法⁷⁾に基づいて確認した。粗アクチニダインに用いたキウイ果実は、硬さと糖度を測定し適熟果のものを使用した⁹⁾。パパイン（EC 3.4.22.2）、ブロメライン（EC 3.4.22.23）、フィシン（EC 3.4.22.3）は、Organo Teknica Co., Sigma Chemical Co. からそれぞれ購入し、そのまま使用した。

3. 調製腱膜

牛腱膜に含まれる酸可溶性コラーゲンと非コラーゲンタンパク質を除く処理をおこなった。すなわち、細切した（3×3×6 mm）試料95 g（湿重量）に0.5 M 酢酸300 mlを加え、Millerの方法¹⁰⁾に従い4℃で48時間抽出した（繰り返し2回）。抽出液を1 M NaOHで中和後、13000×gで20分間遠心分離した。沈殿を冷蒸留水で洗浄し、ろ紙で十分水切り後、0.1 M NaOH 150 mlを加え、Ando *et al.*の方法³⁾に従い4℃で1晩攪拌抽出した（繰り返し3回）。抽出液を0.1 M HClで中和し冷蒸留水で洗浄後、遠心分離をおこない沈殿を凍結した。これを調製腱膜として用いた。

4. 粗アクチニダイン、パパイン、ブロメライン、フィシンによる牛腱膜の溶解

調製腱膜を2グループに分け、1グループは85℃の加熱水に60分間浸した。溶解しなかった残渣100 mg（乾燥標品）に0.5 M 酢酸を10 ml、粗アクチニダイン、パパイン、ブロメライン又はフィシンをそれぞれ、0.5 ml、10 mg、2 mg、0.4 mgを加え70℃で60分間反応処理した。反応条件は、粗アクチニダインのpHが3.5程度であるから、最適pHに近いと考えて0.5 M 酢酸を緩衝液に選択した。また、反応温度70℃は、おでんの煮込みを想定した。反応を終えた70℃処理液を速やかに冷却し13000×gで20分間遠心分離後、上清のコラーゲン量と回収率を測定した。残りの1グループ（未加熱の調製腱膜）を用いて反応処理し

た試料をコントロールとした。パパイン、ブロメライン、フィシン添加量は不溶性コラーゲン（Azocoll）を20～70℃で加水分解したFoegeding *et al.*²⁾の方法に基本的に従った。粗アクチニダインは腱膜が軟らかくなった予備試験の添加量に従った。また、基質の溶解液0.5 M 酢酸を用いたのは、RuantrakoolとChenの方法¹¹⁾も参考にした。

5. ペプシン溶解コラーゲンの調製

Millerの方法に基づいて¹⁰⁾、調整腱膜のコラーゲンテロペプチドをペプシンを含む0.5 M 酢酸中で限定的に切断し、ペプシン溶解コラーゲンを調製した。すなわち、調製腱膜に0.5 M 酢酸とペプシン（腱膜：ペプシン＝100：1）を加え25℃で24時間反応処理した。処理液を遠心分離後、上清を透析してから凍結乾燥した。

6. 溶解性の測定

牛腱膜の溶解は、粗アクチニダイン、パパイン、ブロメライン、フィシンによる反応処理液または85℃と105℃の（熱水）抽出液中のコラーゲン量と回収率で表わした。反応処理液又は抽出液を13000×gで20分間遠心分離後、上清を乾燥した。乾燥標品のうちから3～4 mgを秤量し6 M HCl 1 mlを加え110℃で24時間加水分解した。加水分解液を2.5 M NaOHで中和後、10 mlに蒸留水で希釈した。2 mlを採り、Woessnerの方法¹²⁾に従いヒドロキシプロリン量を測定した。ヒドロキシプロリン量に7.25¹⁾を乗じた値を試料の重量で除し溶解したコラーゲン量とした。残りの乾燥標品の重量を測定し、先に採取した分を加算して開始材料に対する重量を回収率として表わした。

7. SDS-PAGE

加熱および酵素による牛腱膜分解能をLaemmliの方法¹³⁾に基づいてSDS-PAGE分析をおこなった。粗アクチニダイン、パパイン、ブロメライン、フィシンによる反応処理液（凍結標品、コラーゲンとして100–300 µg）を、コラーゲン溶解に用いられる0.2 mM ギ酸ナトリウム緩衝液/20 mM EDTA/10 mM システイン/0.35% 酢酸（pH 3.3）50 µlに溶解した。溶解液50 µlに0.1 M トリス-HCl 緩衝液/1% SDS（pH 6.8）を50 µl、メルカプトエタノールを2 µl、0.1% BPBを3 µl加え、90℃で10分間加熱した。試料液10 µlを10% ゲルに負荷し電気泳動をおこなった後、クマシーブリリアントブルー（CBB）により染色した。

実験結果および考察

1. 牛腱膜の軟化

未調製の腱膜を85℃の蒸留水に60分間浸漬した後、ろ紙で十分水切りをおこない、37℃に冷却してから粗アクチニダイン1 mlと0.1 M 酢酸200 mlを加え37℃で3時間反応処理した。反応処理した腱膜（線維方向に長さ、2 cm、幅、1 cm、厚さ、0.5 cm）をフライパン上で調理加熱した。評価項目は“かみ易さ”と“のみ込み易さ”を併せて“咀嚼性”の1項目とした。同じ組成で粗アクチニダイン処理

をしなかった試料をコントロールとした。コントロールに 0 点を与え -3 ~ +3 の 7 段階尺度を用いた評価をおこない、コントロールと反応試料との間の有意差検定を *t*-検定によりおこなった。官能評価は、粗アクチニジン処理した腱膜がコントロールに対し咀嚼し易いとの結果を得た ($p < 0.01$) (Table 1)。しかし、腱膜中にコラーゲンサブユニット鎖の β および α 成分や非コラーゲタンパク質が存在すると腱膜の主成分である不溶性コラーゲンより先に加水分解し軟化に関わることも考えられる。そこで、腱膜に 0.5 M 酢酸と 0.1 M NaOH 処理をおこない、これらを除いた調製腱膜をつくった。これを試料に溶解性の検討をおこなった。

2. 熱水による溶解性

調製腱膜 (乾燥標品) 500 mg を $1 \times 1 \times 3$ mm の大きさに細切し蒸留水 30 ml を加え、85 又は 105℃ で 30 又は 60 分間抽出した。抽出液を速やかに冷却し $13\,000 \times g$ で 20 分間遠心分離後、上清を乾燥した。乾燥した上清のコラーゲン量と回収率を測定した。結果は Table 2 に示す通りである。85 又は 105℃ の加熱水に溶解した腱膜の回収率は、0.5 ~ 1.3% で、加熱温度と時間の影響について一定の傾向は認められなかった。この結果は、イカ外套膜の沸騰水に対する溶解を大きく下回り³⁾、牛腱膜は加熱水に極めて溶解しにくいことが明らかになった。

3. 粗アクチニジン、パパイン、ブロメライン、フィシンによる腱膜の溶解

粗アクチニジン、パパイン、ブロメライン又はフィシンによる調製腱膜の溶解コラーゲン量および回収率の結果

Table 1 Sensory evaluation of cooked-cattle aponeuroses treated with or without crude actinidin

	Ease of biting
Cooking without actinidin (Control)	0
Cooking with actinidin	$1 \pm 0.53^*$

*: significant at 1% level

Table 2 The extractability of collagen in hot water from cattle aponeuroses

Heating temperature (°C)	Heating time (h)	Yield (%)	Collagen content (mg/g)
20	0.5	0	0
20	1.0	0	0
85	0.5	1.1	0.34
85	1.0	0.9	1.21
105	0.5	0.5	0.04
105	1.0	1.3	1.44

Collagen content : mean of three measurements

を Table 3 に示した。予め 85℃、60 分間加熱した調製腱膜をさらに、0.5 M 酢酸中で植物性チオール系酵素により 70℃ 処理した反応液の溶解腱膜 (回収率) は、粗アクチニジンで 34.7%、パパインで 11.7%、ブロメラインで 6.6%、フィシンで 2.8% を示し酵素の違いによる溶解効果の違いが認められた ($p < 0.01$)。とりわけ、アクチニジンの効果が顕著であった。これは、反応溶液の pH がアクチニジンの最適 pH に近いためと思われた。また、加熱後、植物性チオール系酵素で処理した腱膜からの溶解コラーゲン量は、未加熱腱膜 (コントロール) を植物性チオール系酵素で処理した腱膜のものより大きく何れの酵素で処理した場合でも加熱による効果も認められ ($p < 0.05$)、その効果は粗アクチニジンが最大であった。Foegedding *et al.*²⁾ は、パパイン、ブロメライン、フィシンが中性条件で 20 ~ 70℃ まで毎分 1℃ ずつ温度を上げ、60 ~ 70℃ でも不溶性コラーゲン (Azocoll) を分解することを示したが、筆者らの実験は、平衡化温度に要する時間は 10 分程度であることから、これまでの報告と異なる温度上昇条件における粗アクチニジンの腱膜分解能についてのものである。西山¹⁴⁾ は、I 型コラーゲンに対しアクチニジンは pH 3 の条件で 55℃、3 時間反応させたが、活性はかなり高かったことを報告した。結果はこの条件とも相違した。Table 3 の結果から、溶解した腱膜 (回収率) と溶解コラーゲン量との間に乖離がみられる。吉本ら¹⁵⁾ は、成牛アキレス腱の酸不溶性画分にエラスチンが残存し、ヒドロキシプロリン量はコラーゲンの 1/3 程度であったことを報告した。腱膜のエラスチン量は、アキレス腱より多いといわれていることから、溶解した腱膜 (回収率) に比べ溶解したコラーゲン量が低い値を示したものと思われる。

4. 加熱処理、酢酸処理および粗アクチニジン処理による腱膜の加水分解促進効果

腱膜を次の 3 つの条件で処理した：A、未加熱腱膜を 85℃ の加熱水で 60 分間抽出した；B、未加熱腱膜を 0.5 M

Table 3 The extractability of collagen from crude actinidin-, papain-, bromelain-, ficin-digests of cattle aponeuroses

Enzyme	Treatments			
	Heated yield (%)	Unheated	Heated collagen (mg/g)	Unheated
Blank	0.8	0.9	0.22	0.15
Crude-actinidin	34.7 ^a	35.2 ^a	7.75 ^a	4.25 ^b
Papain	11.7 ^b	11.1 ^b	4.78 ^a	3.91 ^b
Bromelain	6.6 ^c	3.5 ^c	4.48 ^a	2.13 ^b
Ficin	2.8 ^d	2.5 ^d	2.54 ^a	1.18 ^b

Soluble collagen content : mean of three measurements

Blank : treated with no enzyme

The different letter in the same column represent significant difference ($p < 0.01$).

酢酸中で 37℃, 3 時間反応処理した; C, 加熱腱膜 (85℃, 60 分間) を 0.5 M 酢酸溶液中で粗アクチニダインを用い, 37℃, 3 時間反応処理した. 抽出液又は処理液を遠心分離後, 上清を SDS-PAGE 分析し, 結果を Fig. 1 に示した. 85℃ の蒸留水に浸したのみ (A 液) では処理液中に分解物の泳動バンドを検出することはできなかった (Fig. 1 lane b). しかし, 0.5 M 酢酸処理の場合 (B 液), 明瞭ではないが泳動バンドを検出した (Fig. 1 lane d). 加熱水に浸した腱膜をさらに 0.5 M 酢酸中で粗アクチニダインを用いて反応処理すると, 処理液にコラーゲンサブユニット鎖の β 成分および α 成分が SDS-PAGE により明瞭に検知された (Fig. 1 lane f). これは, 牛腱膜の不溶性コラーゲンが粗アクチニダインにより加水分解を受けたのではないかとの示唆を得た. また, 腱膜の局在部位によって抽出のされ方に違いがあることが示唆された. 実験結果の項目 1 に述べたように 0.1 M 酢酸溶液中 37℃ でアクチニダインを作用させる時腱膜の有意の軟化が認められたのは, 本実験の結果からアクチニダインのタンパク質分解効果によるものであることが示唆された. このことは, 腱膜の軟化効果が 70℃ で最大であったのは 70℃ に至る間でのアクチニダインの一過性の活性発現があったことを示唆している (70℃ では失活すると推測されるが).

5. 中性条件における粗アクチニダインによる牛腱膜の加水分解

酸性条件は, 筋肉処理に対しては一般的でないので中性条件における粗アクチニダインによる腱膜分解能を確認した. すなわち, 加熱調製腱膜 (85℃, 60 分間) 10 mg に 0.5 ml の粗アクチニダイン, 10 ml の 0.1 M リン酸緩衝液/0.5

Fig. 1 Effect of crude-actinidin digestion on cattle aponeuroses

(lane a), Type I acid soluble collagen from rat tail tendon (Sigma Chemical Co.); (lane b, d, f, Vertebra cervicalis I~Vertebra thoracicae V; (lane c, e, g, Su-perius; (lane b, c), simmered in hot water at 85℃ for 60 min; (lane d e), extracted un-heated aponeuroses in 0.5 M acetic acid at 37℃ for 3 h; (lane f, g), heated-aponeuroses (85℃, 60 min) treated with crude actinidin in 0.5 M acetic acid at 37℃ for 3 h.

M NaCl (pH 6.0) を加え, 20℃ で 0, 0.5, 1, 4, 6 および 24 時間反応処理し遠心分離後, 上清を凍結乾燥した. 凍結乾燥した処理液を Laemmli の方法¹³⁾ に従い, SDS-PAGE をおこない泳動パターンの分析をおこなった. 加熱しない腱膜を同様に処理した試料をコントロールとした. 結果を Fig. 2 A-B に示した. 反応処理液およびコントロールからコラーゲンサブユニット鎖の泳動バンドを検出することはできなかった (Fig. 2 A-B lane c, d, e, f および g). しかし, 複数の分子量の小さいペプチドが検知された. つぎに, ペプシン溶解腱膜コラーゲンを同じ中性条件で反応処理し SDS-PAGE 分析した (Fig. 3). ペプシン溶解腱膜コラーゲンに含まれる分子量 28KDa のコラーゲンペプチドは中性条件下で粗アクチニダインによりほぼ完全に消化した (Fig. 3 lane b, ←部).

Fig. 2-A SDS-PAGE analysis of crude-actinidin digest of un-heated cattle aponeuroses

(lane a), Mr; (lane b), digested for 0 h at 20℃; (lane c), for 0.5 h; (lane d), for 1 h; (lane e), for 4 h; (lane f), for 6 h; (lane g), for 24 h.

Fig. 2-B SDS-PAGE analysis of crude-actinidin digest of heated cattle aponeuroses

(lane a), Mr; (lane b), digested for 0 h at 20℃; (lane c), for 0.5 h; (lane d), for 1 h; (lane e), for 4 h; (lane f), for 6 h; (lane g), for 24 h.

Fig. 3 Effect of crude-actinidin on the pepsin soluble-collagen

(lane a), Mr ; (lane b), digested for 0 h at 20°C ; (lane c), for 0.5 h ; (lane d), for 1 h ; (lane e), for 4 h ; (lane f), for 6 h.

要 約

(1) 牛腱膜は 85°C の加熱水に約 1% 溶解した。加熱水に溶解しなかった腱膜中にコラーゲンサブユニット鎖の β 成分および α 成分は認められなかった。

(2) 調製腱膜を 85°C の加熱水に 60 分間浸した腱膜を植物性チオール系酵素を用いて酸性条件下で 70°C, 60 分間反応処理した。溶解 (回収率) は, 粗アクチニダイン, 34.7%, パパイン, 11.7%, ブロメライン, 6.6%, フィシン, 2.8% で統計的有意差が認められ ($p < 0.01$), とくに, アクチニダインの効果が顕著であった。

(3) 腱膜は, 加熱水および酢酸溶液にほとんど溶解しなかった。しかし, 加熱した腱膜に酢酸溶液と粗アクチニダインを加え反応処理すると腱膜の不溶性コラーゲンは加水分解しコラーゲンサブユニット鎖の β 成分および α 成分を生成した。

文 献

- 1) Palk, K., *Meat Sci.*, **53**, 189-194 (1999).
- 2) Foegedding, E.A. and Larick, D.K., *Meat Sci.*, **18**, 201-214 (1986).
- 3) Ando, M., Ando, M., Makino, M., Makinodan, Y. and Miyosh, M., *J. Food Sci.*, **6**, 265-269 (2001).
- 4) Gould, B. S., *Treatise on collagen Vol. 2 Biology of Collagen*, pp. 102-103 (1968).
- 5) Lawrie, R.A., *Lawrie's Meat Science 5 th Ed. Section 10. 3*, 4 pp. 244-246 (1998).
- 6) McDowall, M.A., *Eur J. Biochem.*, **14**, 214-221 (1970).
- 7) 大山秀夫, 榎本俊樹, 光永伸一郎, 栄食誌, **50** (1), 57-62 (1997).
- 8) 鮫島邦彦, 中一信, 石下真人, 早川忠昭, 日食工誌, **38**, (9), 817-821 (1991).
- 9) 堤ちはる, 永弘悦子, 田中初美, 中島史絵, 吉中哲子, 家政誌, **49** (1), 5-14 (1998).
- 10) Miller, E.J., *Biochem.*, **11** (26), 4903-4909 (1972).
- 11) Ruantrakool, B., and Chen, T.C., *J. Food Sci.*, **51** (2), 301-304 (1986).
- 12) Woessner, J.F.J., *Arch Biochem Biophys.*, **93**, 440-447 (1961).
- 13) Laemmli, U.K., *Nature.*, **227**, 681-685 (1970).
- 14) 西山一朗, 家政誌, **52** (11), 1083-1089 (2001).
- 15) 吉本久仁男, 柳谷孝幸, 三上正幸, 三浦弘之, *Res. Bull. Obihiro Univ.*, **8**, 405-415 (1974).

(平成 14 年 12 月 13 日受付, 平成 15 年 8 月 8 日受理)